

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP2004/008020

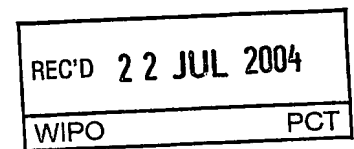
02.06.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 6 月 6 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 1 6 1 4 9 8
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 1 6 1 4 9 8]



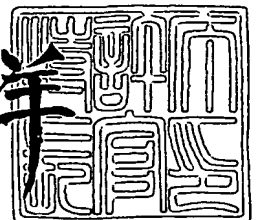
出 願 人 住友製薬株式会社
Applicant(s): 住友化学工業株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 7 月 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 5 9 0 5 2

【書類名】 特許願

【整理番号】 133132

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/67
C12N 15/06

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製
薬株式会社内

【氏名】 青木 幹雄

【特許出願人】

【識別番号】 000183370

【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000002093

【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100121588

【弁理士】

【氏名又は名称】 五十部 穰

【電話番号】 06-6466-5214

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 056546

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0205876

【包括委任状番号】 0305833

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸導入法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の工程 (a) 及び (b) を含む核酸導入法:

(a) 核酸を含有する高張液と細胞とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、高張液の浸透圧を低下させる工程。

【請求項 2】 前記工程 (b) において、低張液と細胞とを接触させることにより浸透圧を低下させる、請求項 1 記載の核酸導入法。

【請求項 3】 核酸がオリゴヌクレチドである、請求項 1 または 2 記載の核酸導入法。

【請求項 4】 オリゴヌクレオチドが、一本鎖オリゴヌクレオチド、二本鎖オリゴヌクレオチドまたはそれらの類縁体である、請求項 3 記載の核酸導入法。

【請求項 5】 オリゴヌクレオチドが、デオキシリボヌクレオチド (DNA)、リボヌクレオチド (RNA)、ホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシ)エチルー修飾核酸 (2'-MOE-修飾核酸)、短い干渉 RNA (siRNA)、架橋型核酸 (LNA)、ペプチド核酸 (PNA) またはモルフォリノ・アンチセンス核酸である、請求項 4 記載の核酸導入法。

【請求項 6】 高張液がオリゴ糖及び多価アルコールから選択される少なくとも 1 種を含有する、請求項 1 ~ 5 いずれか記載の核酸導入法。

【請求項 7】 オリゴ糖が二糖類である、請求項 6 記載の核酸導入法。

【請求項 8】 二糖類がショ糖または乳糖である、請求項 7 記載の核酸導入法。

【請求項 9】 多価アルコールがジオール、トリオール、ポリオールまたは糖アルコールである、請求項 6 記載の核酸導入法。

【請求項 10】 ジオールがグリコール誘導体である、請求項 9 記載の核酸導入法。

【請求項 11】 トリオールがグリセリン誘導体である、請求項 9 記載の核酸導入法。

【請求項 12】 ポリオールがポリグリコール誘導体である、請求項 9 記載の核酸導入法。

【請求項 13】 糖アルコールが単糖アルコール類またはオリゴ糖アルコールである、請求項 9 記載の核酸導入法。

【請求項 14】 オリゴ糖アルコールが二糖アルコール類である、請求項 13 記載の核酸導入法。

【請求項 15】 グリコール誘導体がエチレングリコールである、請求項 10 記載の核酸導入法。

【請求項 16】 グリセリン誘導体がグリセリンである、請求項 11 記載の核酸導入法。

【請求項 17】 ポリグリコール誘導体がポリエチレングリコールである、請求項 12 記載の核酸導入法。

【請求項 18】 ポリエチレングリコールが分子量 2000 以下のものである、請求項 17 記載の核酸導入法。

【請求項 19】 ポリエチレングリコールが PEG 200、PEG 300、PEG 400、PEG 600、PEG 1000、PEG 1500、PEG 1540 または PEG 2000 である、請求項 18 記載の核酸導入法。

【請求項 20】 単糖アルコール類がマンニトール、ソルビトール、キシリトールまたはエリスリトールである、請求項 13 記載の核酸導入法。

【請求項 21】 二糖アルコール類がマルチトール、ラクチトールまたは還元パラチノースである、請求項 14 記載の核酸導入法。

【請求項 22】 高張液が、(1) オリゴ糖および糖アルコールから選択される少なくとも 1 種と、(2) ジオール、トリオールおよびポリオールから選択される少なくとも 1 種とを含有する、請求項 6 記載の核酸導入法。

【請求項 23】 オリゴ糖が二糖類である、請求項 22 記載の核酸導入法。

【請求項 24】 二糖類がショ糖または乳糖である、請求項 23 記載の核酸導入法。

【請求項 25】 糖アルコールが単糖アルコール類またはオリゴ糖アルコールである、請求項 22 記載の核酸導入法。

【請求項 26】 オリゴ糖アルコールが二糖アルコール類である、請求項 25 記載の核酸導入法。

【請求項 27】 単糖アルコール類がマンニトール、ソルビトール、キシリトールまたはエリスリトールである、請求項 25 記載の核酸導入法。

【請求項 28】 二糖アルコール類がマルチトール、ラクチトールまたは還元パラチノースである、請求項 26 記載の核酸導入法。

【請求項 29】 ジオールがグリコール誘導体である、請求項 22 記載の核酸導入法。

【請求項 30】 トリオールがグリセリン誘導体である、請求項 22 記載の核酸導入法。

【請求項 31】 ポリオールがポリグリコール誘導体である、請求項 22 記載の核酸導入法。

【請求項 32】 グリコール誘導体がエチレングリコールである、請求項 29 記載の核酸導入法。

【請求項 33】 グリセリン誘導体がグリセリンである、請求項 30 記載の核酸導入法。

【請求項 34】 ポリグリコール誘導体がポリエチレングリコールである、請求項 31 記載の核酸導入法。

【請求項 35】 ポリエチレングリコールが分子量 2000 以下のものである、請求項 34 記載の核酸導入法。

【請求項 36】 ポリエチレングリコールが PEG 200、PEG 300、PEG 400、PEG 600、PEG 1000、PEG 1500、PEG 1540 または PEG 2000 である、請求項 35 記載の核酸導入法。

【請求項 37】 高張液が、(1) ショ糖、マンニトール、ソルビトールおよびキシリトールから選択される少なくとも 1 種と、(2) PEG 200、PEG 300、PEG 400、PEG 600、PEG 1000、PEG 1500、PEG 1540、PEG 2000 およびグリセリンから選択される少なくとも 1 種とを含有する、請求項 22 記載の核酸導入法。

【請求項 38】 高張液が、(1) ショ糖、マンニトール、ソルビトールまたはキシリトールと、(2) PEG 200、PEG 300、PEG 400、PEG 600、PEG 1000、PEG 1500、PEG 1540、PEG 2000 また

はグリセリンとを含有する、請求項 37 記載の核酸導入法。

【請求項 39】 高張液中に存在するオリゴ糖および／または多価アルコールの総モル濃度が 0.29 M～2 M の範囲内である、請求項 1～38 いずれか記載の核酸導入法。

【請求項 40】 高張液中に存在するオリゴ糖および／または多価アルコールの総モル濃度が 0.5 M～1.1 M の範囲内である、請求項 39 記載の核酸導入法。

【請求項 41】 低張液の浸透圧が等張以下である、請求項 2～40 いずれか記載の核酸導入法。

【請求項 42】 オリゴ糖及び多価アルコールから選択される少なくとも 1 種を成分として含有する、核酸導入用試薬。

【請求項 43】 請求項 1～41 いずれか記載の核酸導入法のために用いられる、請求項 42 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 44】 オリゴ糖が二糖類である、請求項 42 または 43 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 45】 二糖類がショ糖または乳糖である、請求項 44 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 46】 多価アルコールがジオール、トリオール、ポリオールまたは糖アルコールである、請求項 42 または 43 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 47】 ジオールがグリコール誘導体である、請求項 46 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 48】 トリオールがグリセリン誘導体である、請求項 46 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 49】 ポリオールがポリグリコール誘導体である、請求項 46 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 50】 糖アルコールが単糖アルコール類またはオリゴ糖アルコールである、請求項 46 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 51】 オリゴ糖アルコールが二糖アルコール類である、請求項 50 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 5 2】 グリコール誘導体がエチレングリコールである、請求項 4 7 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 5 3】 グリセリン誘導体がグリセリンである、請求項 4 8 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 5 4】 ポリグリコール誘導体がポリエチレングリコールである、請求項 4 9 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 5 5】 ポリエチレングリコールが分子量 2000 以下のものである、請求項 5 4 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 5 6】 ポリエチレングリコールが PEG 200、PEG 300、PEG 400、PEG 600、PEG 1000、PEG 1500、PEG 1540 または PEG 2000 である、請求項 5 5 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 5 7】 単糖アルコール類がマンニトール、ソルビトール、キシリトールまたはエリスリトールである、請求項 5 0 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 5 8】 二糖アルコール類がマルチトール、ラクチトールまたは還元パラチノースである、請求項 5 1 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 5 9】 (1) オリゴ糖および糖アルコールから選択される少なくとも 1 種と、(2) ジオール、トリオールおよびポリオールから選択される少なくとも 1 種とを成分として含有する、請求項 4 2 または 4 3 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 6 0】 オリゴ糖が二糖類である、請求項 5 9 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 6 1】 二糖類がショ糖または乳糖である、請求項 6 0 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 6 2】 糖アルコールが単糖アルコール類またはオリゴ糖アルコールである、請求項 5 9 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 6 3】 オリゴ糖アルコールが二糖アルコール類である、請求項 6 2 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 6 4】 単糖アルコール類がマンニトール、ソルビトール、キシリトールまたはエリスリトールである、請求項 6 2 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 6 5】 二糖アルコール類がマルチトール、ラクチトールまたは還元パラチノースである、請求項 6 3 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 66】 ジオールがグリコール誘導体である、請求項 59 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 67】 トリオールがグリセリン誘導体である、請求項 59 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 68】 ポリオールがポリグリコール誘導体である、請求項 59 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 69】 グリコール誘導体がエチレングリコールである、請求項 66 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 70】 グリセリン誘導体がグリセリンである、請求項 67 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 71】 ポリグリコール誘導体がポリエチレングリコールである、請求項 68 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 72】 ポリエチレングリコールが分子量 2000 以下のものである、請求項 71 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 73】 ポリエチレングリコールが PEG 200、PEG 300、PEG 400、PEG 600、PEG 1000、PEG 1500、PEG 1540 または PEG 2000 である、請求項 72 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 74】 (1) ショ糖、マンニトール、ソルビトールおよびキシリトールから選択される少なくとも 1 種と、(2) PEG 200、PEG 300、PEG 400、PEG 600、PEG 1000、PEG 1500、PEG 1540、PEG 2000 およびグリセリンから選択される少なくとも 1 種とを成分として含有する、請求項 59 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 75】 (1) ショ糖、マンニトール、ソルビトールまたはキシリトールと、(2) PEG 200、PEG 300、PEG 400、PEG 600、PEG 1000、PEG 1500、PEG 1540、PEG 2000 またはグリセリンとを成分として含有する、請求項 74 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 76】 成分が固体または液体の形状にある、請求項 42～75 いずれか記載の核酸導入用試薬。

【請求項 77】 オリゴ糖及び多価アルコールから選択される 2 種以上の成分を

含有する場合に、各成分が各々独立した固体または液体の形状にある、請求項 7 6 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 7 8】 高張液中でのオリゴ糖および／または多価アルコールの総モル濃度が 0.29 M～2 M の範囲内になるようにあらかじめ調製された、請求項 4 2～7 7 いずれか記載の核酸導入用試薬。

【請求項 7 9】 高張液中でのオリゴ糖および／または多価アルコールの総モル濃度が 0.5 M～1.1 M の範囲内になるようにあらかじめ調製された、請求項 7 8 記載の核酸導入用試薬。

【請求項 8 0】 請求項 4 2～7 9 いずれか記載の試薬を含有する核酸導入用キット。

【請求項 8 1】 請求項 4 2～8 0 いずれか記載の試薬またはキットの、核酸導入における使用。

【請求項 8 2】 請求項 4 2～8 0 いずれか記載の試薬またはキットを成分とする核酸導入剤。

【請求項 8 3】 請求項 1～4 1 いずれか記載の導入法により核酸が導入された細胞。

【請求項 8 4】 請求項 1～4 1 いずれか記載の導入法により核酸が導入された、マクロファージ由来 RAW264.7 細胞、初代培養肝細胞、初代培養筋芽細胞、初代培養筋細胞、初代培養前駆脂肪細胞、初代培養脂肪細胞または初代培養神経細胞。

【請求項 8 5】 請求項 8 3 または 8 4 記載の細胞から調製された細胞由来の RNA またはタンパク質。

【請求項 8 6】 請求項 8 3 または 8 4 記載の細胞、若しくは請求項 8 5 記載の RNA またはタンパク質を用いることを特徴とする、導入した核酸に関連する遺伝子またはタンパク質の機能解析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な核酸導入法に関する。より詳細には、本発明は、浸透圧の差

を利用した新規な核酸導入法に関する。

【0002】

【従来の技術】

アンチセンス核酸、短い干渉RNA (siRNA)などのオリゴヌクレオチドの細胞への効率的な導入は、これらの分子を用いた遺伝子機能解析において極めて重要である。従来の遺伝子導入法は、機能性分子の負電荷と細胞膜の負電荷およびそれらとイオン結合するカチオンリポソーム（非特許文献1および2を参照）やポリエチレンイミン（非特許文献3を参照）などの正電荷をもった運搬担体の複合体を細胞へ導入する方法や、細胞透過性ペプチドとオリゴヌクレオチドを共有結合させた融合分子を導入する方法（非特許文献4および5を参照）、細胞に一過性に電氣的に穴をあけて細胞へ導入する方法（非特許文献6を参照）などであった。

【0003】

正電荷をもった運搬担体との複合体を用いる導入法は接着培養細胞株への導入効率は概ね良好であるが、オリゴヌクレオチドー運搬担体複合体の細胞外から細胞内への取り込みにおいては細胞内在性の取り込み機構を用いるため、取り込み活性の低い細胞への導入は困難であった。また、運搬担体自身に細胞毒性や免疫アジュバント活性があるため、リンパ球などの浮遊細胞や初代培養細胞への導入は困難であった。細胞透過性ペプチドとオリゴヌクレオチドを共有結合させた融合分子を導入する方法では、共有結合形成反応効率の問題や反応の煩雑さに加え、オリゴヌクレオチドだけの作用ではなく、細胞透過性ペプチドと機能性分子の共有結合体としての作用しか観察することができないなどの問題があった。また細胞に一過性に電氣的に穴をあけて機能性分子を導入する方法は、電気パルスのため細胞が極度のダメージを受け、多くの細胞が破裂してしまう問題などがあった。このように従来の核酸導入法は各々問題点があるため、細胞種を問わず効率良く核酸を導入することの可能な新たな核酸導入法が望まれている状況にあった。

【0004】

【非特許文献1】

Felgner, et al, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 84, 7413, 1987

【非特許文献 2】

Invitrogen社, FOCUS, Vol. 21, No. 3, 1999

【非特許文献 3】

Boussif, et al, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 92, 7297, 1995

【非特許文献 4】

Thoren et al, FEBS Letters, 482, 265, 2000

【非特許文献 5】

Nagahara, et al, Nature medicine, 4, 1449, 1998

【非特許文献 6】

Neumann, et al, EMBO J, 1, 841, 1982

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規な核酸導入法を提供することを目的とする。より詳細には、本発明は浸透圧の差を利用した新規な核酸導入法を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、運搬担体、細胞透過性ペプチド、電気パルスに依らない核酸の細胞への効率的な導入法を開発することに成功した。すなわち本発明は、細胞外液と細胞内液の浸透圧差を利用し、細胞が外界の溶液を摂取する現象の一つとして知られるpinocytosis（飲作用）を促進し、オリゴヌクレオチド等核酸の細胞への効率的な導入を可能にしたものである。

【0007】

これまでpinocytosisを利用して細胞内へ低分子化合物や蛋白質を導入した報告はなされていた (Craig Y Okada et al., Cell, 29, 33-41, 1982)。しかしながら現在では既に陳腐化した技術となっており、核酸の導入に用いられた報告もない。

【0008】

本発明者らは浸透圧差を利用した核酸を導入する方法につき検討した。すなわ

ち(1) 核酸を含有する高張液と細胞とを接触させてpinocytosisにより核酸を細胞内に取り込ませ、(2) その後前記高張液の浸透圧を低下させて細胞内でpinocytic vesicleを破裂・核酸を細胞内に放出させることにより、核酸を導入する方法につき鋭意検討を行った。その結果驚くべきことに、本方法を用いることにより、従来にない高い効率で核酸を導入できることを見出した。しかも、従来技術では極めて困難であった細胞種へのオリゴヌクレオチドの効率的な導入が可能であることを見出した。また本方法は従来使用していたアジュバント(リポソーム、ポリエチレンイミン等)を使用しない方法であるため、従来法の問題点であった細胞毒性や免疫アジュバント活性も認められない。そのため接着性細胞株だけでなく、細胞毒性への感受性が高い初代培養細胞やリンパ球へのオリゴヌクレオチドの効率的な導入が可能となった。

本発明はかかる知見を基礎にして完成するに至ったものである。

【0009】

すなわち、本発明は、下記に掲げるものである：

- (1) 以下の工程(a)及び(b)を含む核酸導入法：
 - (a) 核酸を含有する高張液と細胞とを接触させる工程、
 - (b) 前記(a)の工程の後、高張液の浸透圧を低下させる工程、
- (2) 前記工程(b)において、低張液と細胞とを接触させることにより浸透圧を低下させる、前記(1)記載の核酸導入法、
- (3) 核酸がオリゴヌクレオチドである、前記(1)または(2)記載の核酸導入法、
- (4) オリゴヌクレオチドが、一本鎖オリゴヌクレオチド、二本鎖オリゴヌクレオチドまたはそれらの類縁体である、前記(3)記載の核酸導入法、
- (5) オリゴヌクレオチドが、デオキシリボヌクレオチド(DNA)、リボヌクレオチド(RNA)、ホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシ)エチルー修飾核酸(2'-MOE-修飾核酸)、短い干渉RNA(s iRNA)、架橋型核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)またはモルフォリノ・アンチセンス核酸である、前記(4)記載の核酸導入法、

【0010】

(6) 高張液がオリゴ糖及び多価アルコールから選択される少なくとも1種を含有する、前記(1)～(5)いずれか記載の核酸導入法、

(7) オリゴ糖が二糖類である、前記(6)記載の核酸導入法、

(8) 二糖類がショ糖または乳糖である、前記(7)記載の核酸導入法、

(9) 多価アルコールがジオール、トリオール、ポリオールまたは糖アルコールである、前記(6)記載の核酸導入法、

(10) ジオールがグリコール誘導体である、前記(9)記載の核酸導入法、

【0011】

(11) トリオールがグリセリン誘導体である、前記(9)記載の核酸導入法、

(12) ポリオールがポリグリコール誘導体である、前記(9)記載の核酸導入法、

(13) 糖アルコールが単糖アルコール類またはオリゴ糖アルコールである、前記(9)記載の核酸導入法、

(14) オリゴ糖アルコールが二糖アルコール類である、前記(13)記載の核酸導入法、

(15) グリコール誘導体がエチレングリコールである、前記(10)記載の核酸導入法、

【0012】

(16) グリセリン誘導体がグリセリンである、前記(11)記載の核酸導入法、

(17) ポリグリコール誘導体がポリエチレングリコールである、前記(12)記載の核酸導入法、

(18) ポリエチレングリコールが分子量2000以下のものである、前記(17)記載の核酸導入法、

(19) ポリエチレングリコールがPEG200、PEG300、PEG400、PEG600、PEG1000、PEG1500、PEG1540またはPEG2000である、前記(18)記載の核酸導入法、

(20) 単糖アルコール類がマンニトール、ソルビトール、キシリトールまた

はエリスリトールである、前記(13)記載の核酸導入法、

【0013】

(21) 二糖アルコール類がマルチトール、ラクチトールまたは還元パラチノースである、前記(14)記載の核酸導入法、

(22) 高張液が、(a) オリゴ糖および糖アルコールから選択される少なくとも1種と、(b) ジオール、トリオールおよびポリオールから選択される少なくとも1種とを含有する、前記(6)記載の核酸導入法、

(23) オリゴ糖が二糖類である、前記(22)記載の核酸導入法、

(24) 二糖類がショ糖または乳糖である、前記(23)記載の核酸導入法、

(25) 糖アルコールが単糖アルコール類またはオリゴ糖アルコールである、前記(22)記載の核酸導入法、

【0014】

(26) オリゴ糖アルコールが二糖アルコール類である、前記(25)記載の核酸導入法、

(27) 単糖アルコール類がマンニトール、ソルビトール、キシリトールまたはエリスリトールである、前記(25)記載の核酸導入法、

(28) 二糖アルコール類がマルチトール、ラクチトールまたは還元パラチノースである、前記(26)記載の核酸導入法、

(29) ジオールがグリコール誘導体である、前記(22)記載の核酸導入法、

(30) トリオールがグリセリン誘導体である、前記(22)記載の核酸導入法、

【0015】

(31) ポリオールがポリグリコール誘導体である、前記(22)記載の核酸導入法、

(32) グリコール誘導体がエチレングリコールである、前記(29)記載の核酸導入法、

(33) グリセリン誘導体がグリセリンである、前記(30)記載の核酸導入法、

(34) ポリグリコール誘導体がポリエチレングリコールである、前記(31)記載の核酸導入法、

(35) ポリエチレングリコールが分子量2000以下のものである、前記(34)記載の核酸導入法、

【0016】

(36) ポリエチレングリコールがPEG200、PEG300、PEG400、PEG600、PEG1000、PEG1500、PEG1540またはPEG2000である、前記(35)記載の核酸導入法、

(37) 高張液が、(a) ショ糖、マンニトール、ソルビトールおよびキシリトールから選択される少なくとも1種と、(b) PEG200、PEG300、PEG400、PEG600、PEG1000、PEG1500、PEG1540、PEG2000およびグリセリンから選択される少なくとも1種とを含有する、前記(22)記載の核酸導入法、

(38) 高張液が、(a) ショ糖、マンニトール、ソルビトールまたはキシリトールと、(b) PEG200、PEG300、PEG400、PEG600、PEG1000、PEG1500、PEG1540、PEG2000またはグリセリンとを含有する、前記(37)記載の核酸導入法、

(39) 高張液中に存在するオリゴ糖および／または多価アルコールの総モル濃度が0.29M～2Mの範囲内である、前記(1)～(38)いずれか記載の核酸導入法、

(40) 高張液中に存在するオリゴ糖および／または多価アルコールの総モル濃度が0.5M～1.1Mの範囲内である、前記(39)記載の核酸導入法、

【0017】

(41) 低張液の浸透圧が等張以下である、前記(2)～(40)いずれか記載の核酸導入法、

(42) オリゴ糖及び多価アルコールから選択される少なくとも1種を成分として含有する、核酸導入用試薬、

(43) 前記(1)～(41)いずれか記載の核酸導入法のために用いられる、前記(42)記載の核酸導入用試薬、

(44) オリゴ糖が二糖類である、前記(42)または(43)記載の核酸導入用試薬、

(45) 二糖類がショ糖または乳糖である、前記(44)記載の核酸導入用試薬、

【0018】

(46) 多価アルコールがジオール、トリオール、ポリオールまたは糖アルコールである、前記(42)または(43)記載の核酸導入用試薬、

(47) ジオールがグリコール誘導体である、前記(46)記載の核酸導入用試薬、

(48) トリオールがグリセリン誘導体である、前記(46)記載の核酸導入用試薬、

(49) ポリオールがポリグリコール誘導体である、前記(46)記載の核酸導入用試薬、

(50) 糖アルコールが単糖アルコール類またはオリゴ糖アルコールである、前記(46)記載の核酸導入用試薬、

【0019】

(51) オリゴ糖アルコールが二糖アルコール類である、前記(50)記載の核酸導入用試薬、

(52) グリコール誘導体がエチレングリコールである、前記(47)記載の核酸導入用試薬、

(53) グリセリン誘導体がグリセリンである、前記(48)記載の核酸導入用試薬、

(54) ポリグリコール誘導体がポリエチレングリコールである、前記(49)記載の核酸導入用試薬、

(55) ポリエチレングリコールが分子量2000以下のものである、前記(54)記載の核酸導入用試薬、

【0020】

(56) ポリエチレングリコールがPEG200、PEG300、PEG400、PEG600、PEG1000、PEG1500、PEG1540またはP

EG2000である、前記(55)記載の核酸導入用試薬、

(57) 単糖アルコール類がマンニトール、ソルビトール、キシリトールまたはエリスリトールである、前記(50)記載の核酸導入用試薬、

(58) 二糖アルコール類がマルチトール、ラクチトールまたは還元パラチノースである、前記(51)記載の核酸導入用試薬、

(59) (a) オリゴ糖および糖アルコールから選択される少なくとも1種と、(b) ジオール、トリオールおよびポリオールから選択される少なくとも1種とを成分として含有する、前記(42)または(43)記載の核酸導入用試薬、

(60) オリゴ糖が二糖類である、前記(59)記載の核酸導入用試薬、

【0021】

(61) 二糖類がショ糖または乳糖である、前記(60)記載の核酸導入用試薬、

(62) 糖アルコールが単糖アルコール類またはオリゴ糖アルコールである、前記(59)記載の核酸導入用試薬、

(63) オリゴ糖アルコールが二糖アルコール類である、前記(62)記載の核酸導入用試薬、

(64) 単糖アルコール類がマンニトール、ソルビトール、キシリトールまたはエリスリトールである、前記(62)記載の核酸導入用試薬、

(65) 二糖アルコール類がマルチトール、ラクチトールまたは還元パラチノースである、前記(63)記載の核酸導入用試薬、

【0022】

(66) ジオールがグリコール誘導体である、前記(59)記載の核酸導入用試薬、

(67) トリオールがグリセリン誘導体である、前記(59)記載の核酸導入用試薬、

(68) ポリオールがポリグリコール誘導体である、前記(59)記載の核酸導入用試薬、

(69) グリコール誘導体がエチレングリコールである、前記(66)記載の核酸導入用試薬、

(70) グリセリン誘導体がグリセリンである、前記(67)記載の核酸導入用試薬、

【0023】

(71) ポリグリコール誘導体がポリエチレングリコールである、前記(68)記載の核酸導入用試薬、

(72) ポリエチレングリコールが分子量2000以下のものである、前記(71)記載の核酸導入用試薬、

(73) ポリエチレングリコールがPEG200、PEG300、PEG400、PEG600、PEG1000、PEG1500、PEG1540またはPEG2000である、前記(72)記載の核酸導入用試薬、

(74) (a) ショ糖、マンニトール、ソルビトールおよびキシリトールから選択される少なくとも1種と、(b) PEG200、PEG300、PEG400、PEG600、PEG1000、PEG1500、PEG1540、PEG2000およびグリセリンから選択される少なくとも1種とを成分として含有する、前記(59)記載の核酸導入用試薬、

(75) (a) ショ糖、マンニトール、ソルビトールまたはキシリトールと、(b) PEG200、PEG300、PEG400、PEG600、PEG1000、PEG1500、PEG1540、PEG2000またはグリセリンとを成分として含有する、前記(74)記載の核酸導入用試薬、

【0024】

(76) 成分が固体または液体の形状にある、前記(42)～(75)いずれか記載の核酸導入用試薬、

(77) オリゴ糖及び多価アルコールから選択される2種以上の成分を含有する場合に、各成分が各々独立した固体または液体の形状にある、前記(76)記載の核酸導入用試薬、

(78) 高張液中でのオリゴ糖および／または多価アルコールの総モル濃度が0.29M～2Mの範囲内になるようにあらかじめ調製された、前記(42)～(77)いずれか記載の核酸導入用試薬、

(79) 高張液中でのオリゴ糖および／または多価アルコールの総モル濃度が

0. 5M～1. 1Mの範囲内になるようにあらかじめ調製された、前記(78)記載の核酸導入用試薬、

(80) 前記(42)～(79)いずれか記載の試薬を含有する核酸導入用キット、

【0025】

(81) 前記(42)～(80)いずれか記載の試薬またはキットの、核酸導入における使用、

(82) 前記(42)～(80)いずれか記載の試薬またはキットを成分とする核酸導入剤、

(83) 前記(1)～(41)いずれか記載の導入法により核酸が導入された細胞、

(84) 前記(1)～(41)いずれか記載の導入法により核酸が導入された、マクロファージ由来RAW264.7細胞、初代培養肝細胞、初代培養筋芽細胞、初代培養筋細胞、初代培養前駆脂肪細胞、初代培養脂肪細胞または初代培養神経細胞、

(85) 前記(83)または(84)記載の細胞から調製された細胞由来のRNAまたはタンパク質、ならびに

(86) 前記(83)または(84)記載の細胞、若しくは前記(85)記載のRNAまたはタンパク質を用いることを特徴とする、導入した核酸に関連する遺伝子またはタンパク質の機能解析方法。

【0026】

【発明の実施の形態】

本発明は、少なくとも以下の工程(a)及び(b)：

(a) 核酸を含有する高張液と細胞とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、高張液の浸透圧を低下させる工程、

を含む核酸導入法を提供する。

【0027】

工程(a)において用いられる核酸は、方法の原理上、その種類に制限は無くどのような核酸であっても導入対象として用いることができる。すなわちオリゴ

ヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのいずれであっても良く、また一本鎖・二本鎖およびこれらの類縁体のいずれの形態であっても良い。本発明の核酸が一本鎖である場合、センス鎖またはアンチセンス鎖のいずれも用いることができる。さらに本発明の核酸がポリヌクレオチドの場合、プラスミドの形態であっても良い。

【0028】

本発明の核酸として好ましくはオリゴヌクレオチドを挙げることができる。方法の原理上、導入するオリゴヌクレオチドの種類に制限はなく、一本鎖オリゴヌクレオチド、二本鎖オリゴヌクレオチドまたはこれらの類縁体のいずれも用いることができる。具体的には、デオキシリボヌクレオチド (DNA)、リボヌクレオチド (RNA)、ホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチド (実施例 1 等参照)、2'-O-(2-メトキシ) エチル-修飾核酸 (2'-MOE-修飾核酸)、短い干渉 RNA (small interfering RNA: siRNA、実施例 2 及び 3 参照)、架橋型核酸 (Locked Nucleic Acid: LNA; Singh, et al, Chem. Commun., 455, 1998)、ペプチド核酸 (Peptide Nucleic Acid: PNA; Nielsen, et al., Science, 254, 1497, 1991)、またはモルフォリノ・アンチセンス核酸 (Morpholino antisense; Summerton and Weller, Antisense & Nucleic Acid Drug Development, 7, 187, 1997) などを例示することができる。

【0029】

本発明の核酸の高張液中での濃度は、細胞への導入が可能な濃度であれば如何なる濃度であっても良いが、通常は $0.01 \mu\text{M} \sim 1 \text{mM}$ の範囲を、好ましくは $1 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$ の範囲を挙げることができる。

【0030】

工程(a)において用いられる高張液は、等張以上の浸透圧を保ち、かつ核酸を含有する当該高張液と細胞とを接触させることにより細胞内への核酸の取り込みを可能とするような溶液であれば、如何なる溶液であっても、本発明の高張液として使用することができる。好ましくはオリゴ糖及び多価アルコールから選択される少なくとも 1 種を含有する高張液が挙げられる。

【0031】

ここでオリゴ糖とは具体的には二糖類、三糖類、四糖類、五糖類または十糖類が挙げられ、好ましくは二糖類が挙げられる。また二糖類としてはショ糖、乳糖、トレハロース、レバンビオース、キトビオース、ビシアノース、サンブビオース、メリビオース、エピセロビオース、ツラノース、ルチノースまたはロビノビオースが挙げられ、好ましくはショ糖または乳糖が挙げられる。

また前記で多価アルコールとは具体的にはジオール、トリオール、ポリオール、糖アルコールが挙げられる。より好ましくはトリオール、ポリオールまたは糖アルコールが挙げられる。

【0032】

ここでジオールとしては、グリコール誘導体が挙げられる。グリコール誘導体としてはエチレングリコールが例示される。

【0033】

またトリオールとしては、グリセリン誘導体が挙げられる。グリセリン誘導体としては、グリセリンが挙げられる。

【0034】

またポリオールとしては、ポリグリコール誘導体が挙げられる。ポリグリコール誘導体としては、ポリエチレングリコールが挙げられる。

当該ポリエチレングリコールは、分子量2000以下のポリエチレングリコールであれば如何なる分子量のものであっても良い。具体的には、PEG200、PEG300、PEG400、PEG600、PEG1000、PEG1500、PEG1540およびPEG2000が例示される。

【0035】

前記で糖アルコールとしては、単糖アルコール類またはオリゴ糖アルコールが挙げられる。

単糖アルコール類としては、マンニトール、ソルビトール、キシリトールまたはエリスリトールが挙げられる。

【0036】

前記でオリゴ糖アルコールとしては、二糖アルコール類が挙げられる。二糖アルコール類としては、マルチトール、ラクチトールまたは還元パラチノースが挙

げられる。

【0037】

本発明の核酸導入法において用いられる高張液は、前記に挙げた種々のオリゴ糖及び多価アルコールの中から選択される少なくとも1種を含有していれば良い。具体的には、前記において列挙した物質、例えばショ糖、乳糖、エチレングリコール、グリセリン、ポリエチレングリコール（分子量2000以下のPEG—例えばPEG200、PEG300、PEG400、PEG600、PEG1000、PEG1500、PEG1540、PEG2000等）、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、エリスリトール、マルチトール、ラクチトールおよび還元パラチノース等の物質の中から、任意に選択した少なくとも1種の物質を含有していれば良く、任意に選択した2種、3種または4種以上の物質を含有していても良い。その際、核酸を含有する当該高張液と細胞とを接触させた際に細胞内への核酸の取り込みを可能とするために、高張液中に存在するオリゴ糖及び／または多価アルコールの総モル濃度が0.29M～2Mの範囲内となるように調製する必要がある。この範囲内であれば如何なるモル濃度であっても良いが、好ましくは0.35M～1.5Mの範囲が挙げられ、より好ましくは0.5M～1.35M、さらに好ましくは0.5M～1.2M、さらに好ましくは0.5M～1.1M、0.6M～1.1M、最も好ましくは0.75M～1.1Mの範囲が挙げられる。

【0038】

本発明の核酸導入法において用いられる高張液は、前記のようにオリゴ糖及び多価アルコールから選択される少なくとも1種を含有していれば良いが、2種以上を含有する場合は、(1)オリゴ糖および糖アルコールから選択される少なくとも1種と、(2)ジオール、トリオールおよびポリオールから選択される少なくとも1種とを含有することが好ましい。

【0039】

ここで用いられるオリゴ糖は、具体的には二糖類、三糖類、四糖類、五糖類、または十糖類が挙げられ、好ましくは二糖類が挙げられる。また二糖類としてはショ糖、乳糖、トレハロース、レバンビオース、キトビオース、ビシアノース、

サンブビオース、メリビオース、エピセロビオース、ツラノース、ルチノースまたはロビノビオースが挙げられ、好ましくはショ糖、乳糖が挙げられる。

また前記で糖アルコールとしては、単糖アルコール類またはオリゴ糖アルコールが挙げられる。

単糖アルコール類としては、マンニトール、ソルビトール、キシリトールまたはエリスリトールが挙げられる。

【0040】

前記でオリゴ糖アルコールとしては、二糖アルコール類が挙げられる。

二糖アルコール類としては、マルチトール、ラクチトールまたは還元パラチノースが挙げられる。

【0041】

前記でジオールとしては、グリコール誘導体が挙げられる。グリコール誘導体としては、エチレングリコールが挙げられる。

【0042】

またトリオールとしては、グリセリン誘導体が挙げられる。グリセリン誘導体としては、グリセリンが挙げられる。

【0043】

またポリオールとしては、ポリグリコール誘導体が挙げられる。ポリグリコール誘導体としては、ポリエチレングリコールが挙げられる。

当該ポリエチレングリコールは、分子量2000以下のポリエチレングリコールであれば如何なる分子量のものであっても良い。具体的には、PEG200、PEG300、PEG400、PEG600、PEG1000、PEG1500、PEG1540およびPEG2000が例示される。

【0044】

以上のような(1)オリゴ糖および糖アルコールから選択される少なくとも1種と、(2)ジオール、トリオールおよびポリオールから選択される少なくとも1種とを含有する本発明の高張液の好ましい組み合わせとしては、(1)ショ糖、マンニトール、ソルビトールおよびキシリトールから選択される少なくとも1種と、(2)PEG200、PEG300、PEG400、PEG600、PE

G1000、PEG1500、PEG1540、PEG2000およびグリセリンから選択される少なくとも1種とを含有する高張液が例示される。

より好ましくは、(1) ショ糖、マンニトール、ソルビトールまたはキシリトールと、(2) PEG200、PEG300、PEG400、PEG600、PEG1000、PEG1500、PEG1540、PEG2000またはグリセリンとを含有する高張液が例示される。

【0045】

このようにオリゴ糖及び多価アルコールから選択される2種以上を含有する本発明の高張液は、当該高張液中に存在するオリゴ糖および／または多価アルコールの総モル濃度が0.29M～2Mの範囲内となるように調製されていれば、成分の各々はどのようなモル濃度であっても良い。好ましくは総モル濃度0.35M～1.5Mの範囲が挙げられ、より好ましくは0.5M～1.35M、さらに好ましくは0.5M～1.2M、さらに好ましくは0.5M～1.1M、0.6M～1.1M、最も好ましくは0.75M～1.1Mの範囲が挙げられる。

【0046】

本発明の高張液がオリゴ糖及び多価アルコールから選択される2種を含有する場合、前記のように総モル濃度が前記の範囲内であれば各々の成分のモル濃度は如何なる値であっても良いが、例えば(1) オリゴ糖および糖アルコールから選択される1種のモル濃度が0.5M～1Mの範囲であり、かつ(2) ジオール、トリオールおよびポリオールから選択される1種のモル濃度が0.1Mである場合などを例示することができる。

【0047】

本発明の高張液は、オリゴ糖及び多価アルコールから選択される少なくとも1種を含有しており、かつ核酸を含有する当該高張液と細胞とを接触させることにより細胞内への核酸の取り込みを可能とするような溶液であれば、如何なる溶液であっても、本発明の高張液として使用することができる。具体的には本発明の高張液は、培養液、緩衝液および／または血清をさらに含有することが好ましく、培養液、緩衝液および血清のいずれも含有することがより好ましい。

【0048】

ここで用いられる培養液は、各々の細胞に合った培養液であればどのような培養液であっても良い。例えばRPMI1640 (Invitrogen社)、DULBECCO'S MODIFIED EAGLE MEDIA (Invitrogen社)、F-10 Nutrient Mixture (Invitrogen社)、F-12 Nutrient Mixture (Invitrogen社)、Iscove's Modified Dulbecco's Media (Invitrogen社) またはMINIMUM ESSENTIAL MEDIA (Invitrogen社) などが例示される。

また緩衝液としては、HEPES緩衝液 (シグマ社)、TRIS緩衝液 (シグマ社)、PBS緩衝液 (Invitrogen社) などが例示される。高張液中の緩衝液の濃度はどのようなモル濃度であっても良い。好ましくはモル濃度 0 M ~ 1 M の範囲が挙げられ、より好ましくは 1 mM ~ 100 mM、最も好ましくは 1 mM ~ 10 mM の範囲が挙げられる。

【0049】

また血清としては、ウシ胎児血清、ウシ血清、仔ウシ血清、ウマ血清などが例示される。高張液中の血清の濃度はどのような濃度であっても良い。好ましくは 0 ~ 20 % (v/v) の範囲が挙げられ、より好ましくは 5 ~ 10 % (v/v) の範囲が挙げられる。

本発明の高張液全体の総モル濃度は、等張 ~ 2 M の範囲内であれば良い。

【0050】

本発明の核酸導入法において用いられる細胞は、方法の原理上、適応細胞種に制限はない。すなわち実施例で示したように、本発明の核酸導入法は、これまで核酸導入が極めて困難であった種々の細胞種への核酸導入を可能とした。従って細胞種を制限することなく、本発明の核酸導入法を適用することができる。

具体的には、通常の核酸導入が容易な細胞は勿論のこと、ハイブリドーマ、初代培養肝細胞、初代培養筋芽細胞、初代培養筋細胞、初代培養前駆褐色脂肪細胞、初代培養褐色脂肪細胞、初代培養前駆白色脂肪細胞、初代培養白色脂肪細胞または初代培養神経細胞等に対して本発明の核酸導入法を適用することができる。

さらに本発明の方法は、原理上細胞の由来する種にとらわれることなく、動物細胞だけでなく、プロトプラスト状態を含む植物細胞、昆虫細胞、線虫細胞などに対しても適応可能である。

【0051】

本発明の核酸導入法は、(a) 核酸を含有する高張液と細胞とを接触させた後に、(b) 前記高張液の浸透圧を低下させることを特徴とする。

ここで前記 (b) において高張液の浸透圧を低下させるためには、具体的には、等張液またはそれ以下の浸透圧の溶液（低張液）と細胞とを接触させれば良く、低張液と細胞とを接触させることにより浸透圧を低下させることがより好ましい。具体的な組成としては、例えば培地：水（好ましくはDEPC処理水）が6：4の比率で混合された低張液を挙げることができる。

【0052】

次に本発明の核酸導入法の実例を示す。

まず導入対象となる細胞を培養する。培養は、各々の細胞に合った培養液を用いて通常の条件（37℃、5%CO₂）下で培養すれば良い。また細胞数（密度）は、各々の細胞が良好に生育できる程度の細胞数であれば良い。

核酸を含有する高張液および低張液は、前述した本発明の高張液および低張液の組成となるように適宜調製すれば良い。

【0053】

細胞への核酸の導入は以下のようにして行う。まず細胞から培養上清を除き、核酸を含有する高張液を添加する。その後適当な時間保温する。保温時間は2分～10分程度が好ましく、10分程度がより好ましい。その後核酸を含有する高張液を除去し、低張液を添加する。その後適当な時間保温しても良いし、また添加した低張液を除去した後ふたたび低張液を添加して適当な時間保温しても良い。保温時間は2分～10分程度が好ましく、2分～5分程度がより好ましい。前記高張液、低張液を添加した後の保温温度は、液体状態を保つ温度であれば特に制限はないが、好ましくは0℃～42℃の範囲が、より好ましくは室温～37℃の範囲が挙げられる。

その後低張液を除去し、通常の増殖培地を添加する。以上の操作により、核酸の導入が達成される。

【0054】

本発明の核酸導入法は、従来にない高い効率（50%以上、好ましくは60%以上

、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上)でオリゴヌクレオチドを導入することができる。しかも、従来技術では極めて困難であった細胞種へのオリゴヌクレオチドの効率的な導入が可能である。また本方法は従来使用していたアジュバント(リポソーム、ポリエチレンジイミン等)を使用しない方法であるため、従来法の問題点であった細胞毒性や免疫アジュバント活性も認められない。そのため接着性細胞株だけでなく、細胞毒性への感受性が高い初代培養細胞やリンパ球へもオリゴヌクレオチドを効率的に導入することができる。

【0055】

本発明は、前記本発明の核酸導入法のために用いられる核酸導入用試薬を提供する。

本発明の核酸導入用試薬は、オリゴ糖及び多価アルコールから選択される少なくとも1種を成分として含有することを特徴とする。

オリゴ糖及び多価アルコールは、従来公知の通常の手法にて調製することができる。

ここでオリゴ糖とは具体的には二糖類が挙げられる。また二糖類としてはショ糖、乳糖、トレハロース、レバンビオース、キトビオース、ビシアノース、サンブビオース、メリビオース、エピセロビオース、ツラノース、ルチノースまたはロビノビオースが挙げられ、好ましくはショ糖、乳糖が挙げられる。

【0056】

また前記で多価アルコールとはジオール、トリオール、ポリオールまたは糖アルコールが挙げられる。より好ましくはトリオール、ポリオールまたは糖アルコールが挙げられる。

ここでジオールとしては、グリコール誘導体が挙げられる。グリコール誘導体としてはエチレングリコールが例示される。

【0057】

またトリオールとしては、グリセリン誘導体が挙げられる。グリセリン誘導体としては、グリセリンが挙げられる。

【0058】

またポリオールとしてはポリグリコール誘導体が挙げられる。ポリグリコール

誘導体としては、ポリエチレングリコールが挙げられる。

当該ポリエチレングリコールは、分子量 2000 以下のポリエチレングリコールであれば如何なる分子量のものであっても良い。具体的には、PEG 200、PEG 300、PEG 400、PEG 600、PEG 1000、PEG 1500、PEG 1540 および PEG 2000 が例示される。

【0059】

前記で糖アルコールとしては単糖アルコール類またはオリゴ糖アルコールが挙げられる。単糖アルコール類としてはマンニトール、ソルビトール、キシリトールまたはエリスリトールが挙げられる。

【0060】

前記でオリゴ糖アルコールとしては、二糖アルコール類が挙げられる。

二糖アルコール類としては、マルチトール、ラクチトールまたは還元パラチノースが挙げられる。

【0061】

本発明の核酸導入用試薬は、前記に挙げた種々のオリゴ糖及び多価アルコールの中から選択される少なくとも 1 種を含有していれば良い。具体的には、前記において列挙した物質、例えばショ糖、乳糖、トレハロース、レバンビオース、キトビオース、ビシアノース、サンプビオース、メリビオース、エピセロビオース、ツラノース、ルチノース、ロビノビオース、エチレングリコール、グリセリン、ポリエチレングリコール（分子量 2000 以下の PEG—例えば PEG 200、PEG 300、PEG 400、PEG 600、PEG 1000、PEG 1500、PEG 1540、PEG 2000 等）、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、エリスリトール、マルチトール、ラクチトールおよび還元パラチノース等の物質の中から、任意に選択した少なくとも 1 種の物質を含有していれば良く、任意に選択した 2 種、3 種または 4 種以上の物質を含有していても良い。その際、本発明の核酸導入用試薬を含む高張液（すなわち核酸導入時に用いられる本発明の高張液）と細胞とを接触させた際に細胞内への核酸の取り込みを可能とするために、高張液中に存在するオリゴ糖及び／または多価アルコールの総モル濃度が 0.29 M～2 M の範囲内となるものであれば、本発明の核酸導入用試薬

中の各成分の濃度はどのようなものであっても良い。なお高張液中のオリゴ糖及び／または多価アルコールの総モル濃度は前記範囲内であれば如何なるモル濃度であっても良いが、好ましくは0.35M～1.5Mの範囲が挙げられ、より好ましくは0.5M～1.35M、さらに好ましくは0.5M～1.2M、さらに好ましくは0.5M～1.1M、0.6M～1.1M、最も好ましくは0.75～1.1Mの範囲が挙げられる。

【0062】

本発明の核酸導入用試薬は、前記のようにオリゴ糖及び多価アルコールから選択される少なくとも1種を含有していれば良いが、2種以上を含有する場合は、

(1) オリゴ糖および糖アルコールから選択される少なくとも1種と、(2) ジオール、トリオールおよびポリオールから選択される少なくとも1種とを含有することが好ましい。

【0063】

ここで用いられるオリゴ糖は、二糖類が挙げられる。また二糖類としてはショ糖、乳糖、トレハロース、レバンビオース、キトビオース、ビシアノース、サンブピオース、メリビオース、エピセロビオース、ツラノース、ルチノースまたはロビノビオースが挙げられ、好ましくはショ糖、乳糖が挙げられる。

また前記で糖アルコールとしては、単糖アルコール類またはオリゴ糖アルコールが挙げられる。

単糖アルコール類としては、マンニトール、ソルビトール、キシリトールまたはエリスリトールが挙げられる。

【0064】

前記でオリゴ糖アルコールとしては、二糖アルコール類が挙げられる。

二糖アルコール類としては、マルチトール、ラクチトールまたは還元パラチノースが挙げられる。

【0065】

前記でジオールとしては、グリコール誘導体が挙げられる。グリコール誘導体としては、エチレングリコールが挙げられる。

またトリオールとしては、グリセリン誘導体が挙げられる。グリセリン誘導体

としては、グリセリンが挙げられる。

【0066】

またポリオールとしては、ポリグリコール誘導体が挙げられる。ポリグリコール誘導体としては、ポリエチレングリコール (PEG) が挙げられる。

当該ポリエチレングリコールは、分子量 2000 以下のポリエチレングリコールであれば如何なる分子量のものであっても良い。具体的には、PEG 200、PEG 300、PEG 400、PEG 600、PEG 1000、PEG 1500、PEG 1540 および PEG 2000 が例示される。

【0067】

以上のような (1) オリゴ糖および糖アルコールから選択される少なくとも 1 種と、(2) ジオール、トリオールおよびポリオールから選択される少なくとも 1 種とを含有する本発明の核酸導入用試薬の好ましい組み合わせとしては、(1) ショ糖、マンニトール、ソルビトールおよびキシリトールから選択される少なくとも 1 種と、(2) PEG 200、PEG 300、PEG 400、PEG 600、PEG 1000、PEG 1500、PEG 1540、PEG 2000 およびグリセリンから選択される少なくとも 1 種とを成分として含有する核酸導入用試薬が例示される。

【0068】

より好ましくは、(1) ショ糖、マンニトール、ソルビトールまたはキシリトールと、(2) PEG 200、PEG 300、PEG 400、PEG 600、PEG 1000、PEG 1500、PEG 1540、PEG 2000 またはグリセリンとを成分として含有する核酸導入用試薬が例示される。

【0069】

このようにオリゴ糖及び多価アルコールから選択される 2 種以上を含有する本発明の核酸導入用試薬は、本発明の核酸導入用試薬を含む高張液（すなわち核酸導入時に用いられる本発明の高張液）と細胞とを接触させた際に細胞内への核酸の取り込みを可能とするために、高張液中に存在するオリゴ糖及び／または多価アルコールの総モル濃度が 0.29 M ~ 2 M の範囲内となるものであれば、本発明の核酸導入用試薬中の各成分の濃度は、どのようなモル濃度であっても良い。

好ましくは、高張液中のオリゴ糖及び／または多価アルコールの総モル濃度 0.35 M～1.5 M の範囲が挙げられ、より好ましくは 0.5 M～1.35 M、さらに好ましくは 0.5 M～1.2 M、さらに好ましくは 0.5 M～1.1 M、0.6 M～1.1 M、最も好ましくは 0.75～1.1 M の範囲が挙げられる。

【0070】

本発明の核酸導入試薬がオリゴ糖及び多価アルコールから選択される 2 種を含有する場合、前記のように高張液中でのこれら 2 種の成分の総モル濃度が前記の範囲内であれば、各々の成分のモル濃度は如何なる値であっても良いが、例えば、高張液中における (1) オリゴ糖および糖アルコールから選択される 1 種のモル濃度が 0.5 M～1 M の範囲であり、かつ (2) ジオール、トリオールおよびポリオールから選択される 1 種のモル濃度が 0.1 M である場合などを例示することができる。

【0071】

本発明の核酸導入用試薬中の各成分は、固体の形状であっても、また液体の形状であっても良い。ここで固体の形状とは、ロウ状の形態、ワセリン状の形態、フレーク状の形態、結晶化された形態、粉状の形態などを指す。また液体の形状とは、高粘性の形態、低粘性の形態、非粘性の形態などを指す。

オリゴ糖及び多価アルコールから選択される 2 種以上の成分を含有する場合は、各々の成分は、独立した固体または液体の形状であっても、また混合した固体または液体の形状であっても良い。

【0072】

ここで独立した固体とは、各成分が別個に固体化していることを指す。各々の成分は 1 つの容器中に封入されていても良く、また別々の容器中に封入されていても良い。また前記で独立した液体とは、各々の成分が液体の状態別々の容器中に封入されていることを指す。

前記で混合した固体とは、各成分が固体の形状で混合されている形態、または各成分が混合した状態で固形化され、1 つの容器中に封入された形態を指す。また前記で混合した液体とは、各成分が液体の状態混合され 1 つの容器中に封入されている形態、または 1 つの成分が液体の状態他方の成分が固体の状態で混

合され1つの容器中に封入されている形態を指す。

【0073】

具体的には、例えば（１）オリゴ糖および糖アルコールから選択される少なくとも１種が結晶化されており、かつ（２）ジオール、トリオールおよびポリオールから選択される少なくとも１種がワックス状の形態にある場合が例示される。この場合、両者は１つの容器中に封入することが可能である。より具体的には、（１）結晶化されたショ糖、および（２）ワックス状のポリエチレングリコールが１つの容器中に封入された形態が例示される。

各々の成分が固体の形状にある場合、それぞれの成分にあった方法（加熱、希釈等）により溶解すれば良い。最終的に、培養液、緩衝液及び／または血清等を添加することにより、前記に示したモル濃度を示す本発明の高張液となるように調製すれば良い。

【0074】

以上のような本発明の核酸導入用試薬は、核酸導入用のキットの一成分とすることができる。当該キットは、前記本発明の核酸導入試薬のみからなるキットであっても、また本発明の核酸導入試薬と他の成分とを含むキットであっても良い。当該キット中の他の成分としては、蛍光標識オリゴヌクレオチド、ポジティブコントロールsiRNAなどが挙げられる。

【0075】

本発明の核酸導入用試薬およびキットは、核酸の導入を可能とするための核酸導入剤として使用することができる。

【0076】

本発明は、前記本発明の核酸導入法により核酸が導入された細胞を提供する。

前述のように、本発明の核酸導入法により、高い効率で細胞に核酸導入することが可能となった。また、従来核酸の導入が困難であった種々の細胞にも核酸を導入できるようになった。本発明は、このような本発明の核酸導入法により核酸が導入された細胞を提供するものである。

本発明の細胞は、本発明の核酸導入法により核酸導入された如何なる細胞であっても良いが、例えばマクロファージ由来RAW264.7細胞、初代培養肝細胞、初代

培養筋芽細胞、初代培養筋細胞、初代培養前駆脂肪細胞、初代培養脂肪細胞または初代培養神経細胞に対して本発明の核酸導入法により核酸導入された細胞が挙げられる。

【0077】

好ましくは、従来核酸導入が困難であった細胞、すなわちマクロファージ由来RAW264.7細胞、初代培養肝細胞、初代培養筋芽細胞、初代培養筋細胞、初代培養前駆脂肪細胞、初代培養脂肪細胞または初代培養神経細胞に対して本発明の核酸導入法により核酸導入された細胞が挙げられる。

これらの細胞は、前記本発明の核酸導入法により作製することができる。

【0078】

本発明は、前記本発明の細胞から調製された細胞由来のRNAまたはタンパク質を提供する。これら細胞由来のRNAやタンパク質を調製する方法は既に公知であり、たとえばMolecular Cloning 3rd Edition (Cold Spring Harbor Press)、Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc)などを参考にして容易に行うことができる。

【0079】

本発明は、前記本発明の細胞、若しくは前記本発明のRNAまたはタンパク質を用いることを特徴とする、導入した核酸に関連する遺伝子またはタンパク質の機能解析方法も提供する。

本発明の核酸導入法は、前記のようにどのような核酸導入をも可能とするものであるが、標的遺伝子の発現・機能を抑制する、すなわちノックダウン細胞を作製する際に、特に好ましく用いることができる。

たとえばノックダウン細胞を用いた機能解析としてはアンチセンス核酸、短い干渉RNAまたはおとり型核酸を導入し、標的遺伝子またはその遺伝子がコードする蛋白質の生成または機能を抑制し、当該遺伝子の細胞での働きを調べることなどが挙げられる。

【0080】

本発明の機能解析方法は、従来核酸導入が困難であった細胞、すなわちマクロファージ由来RAW264.7細胞、初代培養肝細胞、初代培養筋芽細胞、初代培養筋細胞

胞、初代培養前駆脂肪細胞、初代培養脂肪細胞または初代培養神経細胞に対して本発明の核酸導入法により核酸導入された細胞や、当該細胞由来のRNA、タンパク質を用いて行うことが好ましい。

【0081】

【実施例】

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。しかし、本発明はこれらの実施例になんら限定されるものではない。

【0082】

実施例1

本発明核酸導入法および従来法を用いたマウスマクロファージ細胞株RAW264.7細胞へのオリゴヌクレオチドの導入

マウスマクロファージ細胞株RAW264.7細胞を用いて、浸透圧ショックによる本発明の核酸導入法（以下Osmotic transfection法と称する）と従来法との比較を行った。

【0083】

1-1) 本発明核酸導入法によるマウスマクロファージ細胞株RAW264.7細胞へのオリゴヌクレオチドの導入

1. 細胞の調製

RAW264.7細胞（ATCC No.TIB-71）を10%（v/v）ウシ胎仔血清含有RPMI1640（Invitrogen）に懸濁し、24ウェルプレート（Nalge Nunc）に100000細胞/ウェルの密度で細胞を播き、37℃、5%CO₂の条件で一晩培養した。

2. オリゴヌクレオチド含有高張液の調製

オリゴヌクレオチド含有高張液は以下の組成：10 μ M FITC標識オリゴヌクレオチド（18-mer；5'-GGA ACT TCC CTA AAG GGA GG -3'；配列番号：1）、1Mショ糖、10%（w/v）ポリエチレングリコール1000、RPMI1640（Invitrogen）、5%（v/v）ウシ胎児血清、10mM HEPES緩衝液（pH7.4）になるように調製した。

3. 低張液の調製

低張液は、RPMI1640培地：DEPC処理水（6:4）混合液になるように調製した。

【0084】

4. 生育培地

RPMI1640 (Invitrogen) にウシ胎児血清、硫酸カナマイシンをそれぞれ10% (v/v)、60mg/L加えて調製した。

5. 24well plateでの導入

RAW264.7細胞を各wellに100,000細胞ずつ播き、終夜培養したのちに培養上清を除き、オリゴヌクレオチド含有高張液を400 μ l添加した。次に、37℃で10分間保温したのち、オリゴヌクレオチド含有高張液を除き、低張液3mlを添加し、すぐに低張液を除いた。再び低張液3mlを添加し、5分間保温したのち低張液を除去し、増殖培地3mlを添加した。

【0085】

6. 導入効率の観察

導入効率の観察は蛍光顕微鏡システム：紫外光源アキシオバード135用蛍光検鏡装置(Carl Zeiss)による励起光をFITCバンドパスフィルターを通し、20x対物レンズ、超高感度CCDカメラ(浜松ホトニクス)搭載微分干渉顕微鏡アキシオバード135 (Carl Zeiss) を用いて実施した。導入24時間後にFITCの蛍光を上記蛍光顕微鏡システムによって2秒間露光して撮影した。細胞の形態は同システムにて可視光源、フィルターなしの条件下で0.03秒間露光して撮影した。

【0086】

1-2) Oligofectamineによるマウスマクロファージ細胞株RAW264.7細胞へのオリゴヌクレオチドの導入

1. 細胞の調製

RAW264.7細胞 (ATCC No. TIB-71) を10% (v/v) ウシ胎仔血清含有RPMI1640 (Invitrogen) に懸濁し、24ウェルプレート (Nalge Nunc) に100000細胞/ウェルの密度で細胞を播き、37℃、5%CO₂の条件で一晩培養した。

【0087】

2. オリゴヌクレオチドの導入

オリゴヌクレオチド/Oligofectamine混合液の調製はInvitrogen社の推奨マニュアルに従って実施した。具体的には、Oligofectamine 9 μ lを150 μ lのOPTI-MEMI (Invitrogen) に懸濁し、室温で5分間静置後、等量のオリゴヌクレオチド希

釈液 (20 μ M FITC標識オリゴヌクレオチド 9 μ l と 150 μ l の OPTI-MEMI の混合液) と混和し、20分間室温に置いたものをオリゴヌクレオチド/ Oligofectamine 混合液として用いた。その後、上記24wellプレートで調製した細胞をOPTI-MEMIにて洗浄、培養上清を除去し、オリゴヌクレオチド/ Oligofectamine 2000混合液 318 μ l を静かに加え、6時間37℃、5%CO₂下で静置後、上清を除去し、増殖培地10% (v/v) ウシ胎仔血清含有RPMI1640 (Invitrogen) を3ml添加し、37℃、5%CO₂下で導入後24時間培養を行った。

3. 導入効率の観察

導入効率の観察は上記実施例1-1)と同様にCCDカメラを用いて実施した。

【0088】

1-3) ポリエチレンイミンによるマウスマクロファージ細胞株RAW264.7細胞へのオリゴヌクレオチドの導入

1. 細胞の調製

RAW264.7細胞 (ATCC No. TIB-71) を10% (v/v) ウシ胎仔血清含有RPMI1640 (Invitrogen) に懸濁し、24ウェルプレート (Nalge Nunc) に100000細胞/ウェルの密度で細胞を播き、37℃、5%CO₂の条件で一晩培養した。

2. オリゴヌクレオチドの導入

ポリエチレンイミンとしてはjetPEI (PolyPlus社) を用いた。オリゴヌクレオチド/ポリエチレンイミン混合液の調製はPolyPlus社の推奨マニュアルに従って実施した。具体的には、7.5mM jetPEI 8 μ l を192 μ l の150mM NaCl水溶液(ナカライテスク)に懸濁し、等量のオリゴヌクレオチド希釈液 (20 μ M FITC標識オリゴヌクレオチド 40 μ l と 160 μ l の150mM NaCl水溶液) と混和し、15分間室温に置いたものをオリゴヌクレオチド/ポリエチレンイミン混合液として用いた。その後、上記24wellプレートで調製した細胞にオリゴヌクレオチド/ポリエチレンイミン混合液 400 μ l を静かに加え、24時間、37℃、5%CO₂下で導入後24時間培養を行った。

3. 導入効率の観察

導入効率の観察は上記実施例1-1)と同様にCCDカメラを用いて実施した。

【0089】

1-4) 本発明核酸導入法、Oligofectamine法およびポリエチレンジアミン法によるオリゴヌクレオチド導入結果の比較

前記本発明核酸導入法、Oligofectamine法およびポリエチレンジアミン法によるFITC標識オリゴヌクレオチド導入24時間後の細胞の形態、細胞へのダメージおよび導入効率を比較した。結果を図1に示す。

その結果、本発明核酸導入法では細胞の形態変化、ダメージはみとめられず、また視野中の80%以上の細胞にオリゴヌクレオチドの導入がみとめられた。一方、Oligofectamine法、およびポリエチレンジアミン法では視野中のほとんどすべての細胞に蛍光オリゴヌクレオチドの導入がみとめられたが、導入操作時の細胞の剥離による細胞数の減少が認められると同時に明視野中の全ての細胞に形態変化がみとめられ、ほとんどの細胞がバーストし、細胞死がみとめられた。これらの結果から、本発明核酸導入法は、Oligofectamine法、およびポリエチレンジアミン法とは異なり、細胞に形態変化やダメージを与えることなく、オリゴヌクレオチドを導入できることが分かった。

【0090】

実施例 2

本発明核酸導入法によるRAW264.7細胞へのTLR4 siRNAの導入と定量的PCRによるsiRNA効果の測定

1. 本発明核酸導入法によるRAW264.7細胞へのTLR4 siRNAの導入

TLR4 siRNA (sense配列5'-AUCCACAAGUCAUUCUCUU-3';配列番号: 2、antisense配列5'-GAGAGAUUGACUUGUGGAUUU-3';配列番号: 3の二本鎖RNA) はProligo社にて合成した。Negative Control #1 siRNAはAmbion社から購入した。本発明核酸導入法によるRAW264.7細胞へのTLR4 siRNAおよびNegative Control #1 siRNAの導入は上記実施例1-1)と同様に10 μ Mの TLR4 siRNAあるいはNegative Control #1 siRNAを含有する高張液を調製し、実施例1-1)と同手法にて実施した。

【0091】

2. 導入細胞からのトータルRNAの回収

導入24時間後にQiagen社RNeasy kitを用いて細胞からトータルRNAを回収し、TLR4 mRNAに特異的なプライマーおよびノーマライゼーションコントロールである

GAPDH mRNAに特異的なプライマーを用いて、定量的PCRを実施した。Negative Control #1 siRNA導入群とTLR4 siRNA導入群におけるGAPDHの発現量を等しいものとみなし、TLR4 mRNAの低減の割合を計算した。結果を図2に示す。

その結果、TLR4 siRNA導入群ではNegative Control #1 siRNA導入群と比較してTLR4 mRNAが83%消失していることが分かった。

以上の結果から、本発明核酸導入法によって蛍光標識オリゴヌクレオチドだけでなくsiRNAも導入することができること、導入したsiRNAは高い効率で細胞のmRNAを消失させることが分かった。

【0092】

実施例3

本発明核酸導入法によるRAW264.7細胞へのTLR4 siRNAの導入とノックダウン細胞を用いたバイオアッセイ

TLR4はLPS(Calbiochem)、GLA-60 (WAKO CHEMICAL) の受容体であり、RAW264.7細胞をこれらの化合物で刺激するとTNF α の産生が誘導されることが知られている。そこで、実施例2に記載のようにRAW264.7細胞にTLR4 siRNAを導入し、24時間後に細胞をスクレーパーで剥がし、増殖培地に懸濁し、10000細胞を96wellプレートの各wellに播き、37℃、5%CO₂にて培養を行った。siRNAの導入48時間後に培養上清を除去し、無刺激、10 μ g/ml GLA-60、10ng/ml LPSにて8時間刺激を行い、培養上清を回収した。対照として、TLR4 siRNAの代わりにNegative Control #1 siRNA (Sequitur社) を同条件にて導入し、48時間後に培養上清を除去し、無刺激、10 μ g/ml GLA-60、10ng/ml LPSにて8時間刺激を行い、培養上清を回収した。

【0093】

TLR4 siRNA導入細胞および対照細胞の培養上清に含まれるTNF α をMouse TNF- α AN'ALYZA ELISAキット (コスモバイオ) にて定量した。結果を図3に示す。その結果、TLR4 siRNA導入細胞では対照細胞と比較してLPS刺激によるTNF α の産生が45%、GLA-60刺激によるTNF α の産生が66%低減することが分かった。

これらの結果から、本発明核酸導入法によってNegative Control siRNAを導入した細胞では通常の細胞と同様にLPS、あるいはGLA-60の刺激に応じたTNF α の産

生誘導がみとめられるが、TLR4 siRNA導入細胞ではこれらの刺激に応じたTNF α の産生誘導が有意に抑制されることが分かり、本発明核酸導入法によるsiRNAの導入によって細胞機能が抑制されたことが示され、具体的には受容体-リガンド対の同定などの遺伝子機能の解析に有効であることが示された。

【0094】

実施例 4

本発明核酸導入法によるラット初代培養肝細胞へのオリゴヌクレオチドの導入

1. 細胞の調製

ラット初代培養肝細胞は株式会社ホクドーより購入した。具体的には、24ウェルプレート (Nalge Nunc) に100000細胞/ウェルの密度で細胞を播いた状態で入荷し、入荷後直ちに添付の生育培地に交換し、37℃、5%CO₂の条件で一晩培養した。

【0095】

2. オリゴヌクレオチド含有高張液の調製

オリゴヌクレオチド含有高張液は以下の組成：10 μ M FITC標識オリゴヌクレオチド (18-mer ; 5'- GGA ACT TCC CTA AAG GGA GG -3' ; 配列番号：1)、1Mショ糖、10% (w/v) ポリエチレングリコール1000、RPMI1640 (Invitrogen)、5%(v/v) ウシ胎児血清、10mM HEPES緩衝液 (pH7.4) になるように調製した。

3. 低張液の調製

低張液は、RPMI1640培地：DEPC処理水 (6:4) 混合液になるように調製した。

【0096】

4. 生育培地

ホクドーの培養キットに添付の培地を用いた。

5. 24well plateでの導入

肝細胞の培養上清を除き、オリゴヌクレオチド含有高張液を400 μ l添加した。室温で3分間保温したのち、オリゴヌクレオチド含有高張液を除き、低張液3mlを添加し、すぐに低張液を除いた。再び低張液3mlを添加し、室温で5分間保温したのち低張液を除去し、増殖培地3mlを添加した。

【0097】

6. 導入効率の観察

導入効率の観察は蛍光顕微鏡システム：紫外光源アキシオバード135用蛍光検鏡装置(Carl Zeiss)による励起光をFITCバンドパスフィルターを通し、20x対物レンズ、超高感度CCDカメラ(浜松ホトニクス)搭載微分干渉顕微鏡アキシオバード135(Carl Zeiss)を用いて実施した。導入24時間後にFITCの蛍光を上記蛍光顕微鏡システムによって2秒間露光して撮影した。細胞の形態は同システムにて可視光源、フィルターなしの条件下で0.03秒間露光して撮影した。

7. 結果

視野中のほとんどすべての細胞に蛍光オリゴヌクレオチドの導入がみとめられた。また、明視野中の細胞に形態変化、細胞死はみとめられなかった。

【0098】

実施例 5

本発明核酸導入法によるラット初代培養筋芽細胞へのオリゴヌクレオチドの導入

1. 細胞の調製

ラット初代培養筋芽細胞は株式会社ホクドーより購入した。具体的には、24ウェルプレート(Nalge Nunc)に100000細胞/ウェルの密度で細胞を播いた状態で入荷し、入荷後直ちに添付の生育培地に交換し、37℃、5%CO₂の条件で一晩培養した。

2. オリゴヌクレオチド含有高張液の調製

オリゴヌクレオチド含有高張液は以下の組成：10 μ M FITC標識オリゴヌクレオチド(18-mer; 5'-GGA ACT TCC CTA AAG GGA GG -3'; 配列番号: 1)、1Mシヨ糖、10%(w/v)ポリエチレングリコール1000、RPMI1640(Invitrogen)、5%(v/v)ウシ胎児血清、10mM HEPES緩衝液(pH7.4)になるように調製した。

3. 低張液の調製

低張液は、RPMI1640培地：DEPC処理水(6:4)混合液になるように調製した。

【0099】

4. 生育培地

ホクドーの培養キットに添付の培地を用いた。

5. 24well plateでの導入

筋芽細胞の培養上清を除き、オリゴヌクレオチド含有高張液を400 μ l添加した。室温で10分間保温したのち、オリゴヌクレオチド含有高張液を除き、低張液3mlを添加し、すぐに低張液を除いた。再び低張液3mlを添加し、室温で5分間保温したのち低張液を除去し、増殖培地3mlを添加した。

【0100】

6. 導入効率の観察

導入効率の観察は蛍光顕微鏡システム：紫外光源アキシオバード135用蛍光検鏡装置(Carl Zeiss)による励起光をFITCバンドパスフィルターを通し、20x対物レンズ、超高感度CCDカメラ(浜松ホトニクス)搭載微分干渉顕微鏡アキシオバード135 (Carl Zeiss) を用いて実施した。導入24時間後にFITCの蛍光を上記蛍光顕微鏡システムによって2秒間露光して撮影した。細胞の形態は同システムにて可視光源、フィルターなしの条件下で0.03秒間露光して撮影した。

7. 結果

視野中のほとんどすべての細胞に蛍光オリゴヌクレオチドの導入がみとめられた。また、明視野中の細胞に形態変化、細胞死はみとめられなかった。

【0101】

実施例 6

本発明核酸導入法によるラット初代培養筋細胞へのオリゴヌクレオチドの導入

1. 細胞の調製

ラット初代培養筋芽細胞は株式会社ホクドーより購入した。具体的には、24ウェルプレート (Nalge Nunc) に100000細胞/ウェルの密度で細胞を播いた状態で入荷し、入荷後直ちに添付の生育培地に交換し、37℃、5%CO₂の条件で一晩培養した。その後、培養上清を除き、添付の筋分化培地に交換し、5日間培養を行い、分化筋細胞を得た。

2. オリゴヌクレオチド含有高張液の調製

オリゴヌクレオチド含有高張液は以下の組成：10 μ M FITC標識オリゴヌクレオチド (18-mer ; 5'-GGA ACT TCC CTA AAG GGA GG -3' ; 配列番号 : 1) 、1Mショ糖、10%(w/v) ポリエチレングリコール1000、RPMI1640 (Invitrogen) 、5%(v/v) ウシ胎児血清、10mM HEPES緩衝液 (pH7.4) になるように調製した。

3. 低張液の調製

低張液は、RPMI1640培地：DEPC処理水（6:4）混合液になるように調製した。

【0102】

4. 生育培地

ホクドーの培養キットに添付の培地を用いた。

5. 24well plateでの導入

分化筋細胞の培養上清を除き、オリゴヌクレオチド含有高張液を400 μ l添加した。室温で10分間保温したのち、オリゴヌクレオチド含有高張液を除き、低張液3mlを添加し、すぐに低張液を除いた。再び低張液3mlを添加し、室温で5分間保温したのち低張液を除去し、増殖培地3mlを添加した。

【0103】

6. 導入効率の観察

導入効率の観察は蛍光顕微鏡システム：紫外光源アキシオバード135用蛍光検鏡装置(Carl Zeiss)による励起光をFITCバンドパスフィルターを通し、20x対物レンズ、超高感度CCDカメラ(浜松ホトニクス)搭載微分干涉顕微鏡アキシオバード135(Carl Zeiss)を用いて実施した。導入24時間後にFITCの蛍光を上記蛍光顕微鏡システムによって2秒間露光して撮影した。細胞の形態は同システムにて可視光源、フィルターなしの条件下で0.03秒間露光して撮影した。

7. 結果

視野中のほとんどすべての細胞に蛍光オリゴヌクレオチドの導入がみとめられた。また、明視野中の細胞に形態変化、細胞死はみとめられなかった。

【0104】

実施例 7

本発明核酸導入法によるラット初代培養脂肪細胞へのオリゴヌクレオチドの導入

1. 細胞の調製

ラット初代培養前駆白色脂肪細胞は株式会社ホクドーより購入した。具体的には、24ウェルプレート(Nalge Nunc)に100000細胞/ウェルの密度で細胞を播いた状態で入荷し、入荷後直ちに添付の分化培地に交換し培養を行い、分化白色脂肪細胞を得た。

2. オリゴヌクレオチド含有高張液の調製

オリゴヌクレオチド含有高張液は以下の組成: 10 μ M FITC標識オリゴヌクレオチド (18-mer; 5'-GGA ACT TCC CTA AAG GGA GG -3'; 配列番号: 1)、1M ショ糖、10%(w/v) ポリエチレングリコール1000、RPMI1640 (Invitrogen)、5%(v/v) ウシ胎児血清、10mM HEPES緩衝液 (pH7.4) になるように調製した。

3. 低張液の調製

低張液は、RPMI1640培地:DEPC処理水 (6:4) 混合液になるように調製した。

【0105】

4. 生育培地

ホクドーの培養キットに添付の培地を用いた。

5. 24well plateでの導入

分化脂肪細胞の培養上清を除き、オリゴヌクレオチド含有高張液を400 μ l 添加した。室温で10分間保温したのち、オリゴヌクレオチド含有高張液を除き、低張液3mlを添加し、すぐに低張液を除いた。再び低張液3mlを添加し、室温で2分間保温したのち低張液を除去し、増殖培地3mlを添加した。

【0106】

6. 導入効率の観察

導入効率の観察は蛍光顕微鏡システム: 紫外光源アキシオバード135用蛍光検鏡装置(Carl Zeiss)による励起光をFITCバンドパスフィルターを通し、20x対物レンズ、超高感度CCDカメラ(浜松ホトニクス)搭載微分干渉顕微鏡アキシオバード135 (Carl Zeiss) を用いて実施した。導入24時間後にFITCの蛍光を上記蛍光顕微鏡システムによって2秒間露光して撮影した。細胞の形態は同システムにて可視光源、フィルターなしの条件下で0.03秒間露光して撮影した。

7. 結果

視野中のほとんどすべての細胞に蛍光オリゴヌクレオチドの導入がみとめられた。また、明視野中の細胞に形態変化、細胞死はみとめられなかった。

【0107】

実施例 8

本発明核酸導入法によるラット初代培養神経細胞へのオリゴヌクレオチドの導入

1. 細胞の調製

ラット初代培養神経細胞は住友ベークライト株式会社より購入した。具体的には、添付の24ウェルプレート（住友ベークライト）に100000細胞/ウェルの密度で細胞を播き、添付の培地に交換し培養を行い、神経細胞を得た。

2. オリゴヌクレオチド含有高張液の調製

オリゴヌクレオチド含有高張液は以下の組成：10 μ M FITC標識オリゴヌクレオチド（18-mer；5'- GGA ACT TCC CTA AAG GGA GG -3'；配列番号：1）、1Mシヨ糖、10%(w/v)ポリエチレングリコール1000、RPMI1640（Invitrogen）、5%(v/v)ウシ胎児血清、10mM HEPES緩衝液（pH7.4）になるように調製した。

3. 低張液の調製

低張液は、RPMI1640培地：DEPC処理水（6:4）混合液になるように調製した。

【0108】

4. 生育培地

ホクドーの培養キットに添付の培地を用いた。

5. 24well plateでの導入

神経細胞の培養上清を除き、オリゴヌクレオチド含有高張液を400 μ l添加した。室温で10分間保温したのち、オリゴヌクレオチド含有高張液を除き、低張液3mlを添加し、すぐに低張液を除いた。再び低張液3mlを添加し、室温で2分間保温したのち低張液を除去し、増殖培地3mlを添加した。

【0109】

6. 導入効率の観察

導入効率の観察は蛍光顕微鏡システム：紫外光源アキシオバード135用蛍光検鏡装置(Carl Zeiss)による励起光をFITCバンドパスフィルターを通し、20x対物レンズ、超高感度CCDカメラ(浜松ホトニクス)搭載微分干渉顕微鏡アキシオバード135(Carl Zeiss)を用いて実施した。導入24時間後にFITCの蛍光を上記蛍光顕微鏡システムによって2秒間露光して撮影した。細胞の形態は同システムにて可視光源、フィルターなしの条件下で0.03秒間露光して撮影した。

7. 結果

視野中のほとんどすべての細胞に蛍光オリゴヌクレオチドの導入がみとめられ

た。また、明視野中の細胞に形態変化、細胞死はみとめられなかった。

【0110】

実施例 9

本発明核酸導入法および従来法を用いたラット初代培養前駆脂肪細胞へのオリゴヌクレオチドの導入

ラット初代培養前駆脂肪細胞を用い、本発明核酸導入法と従来法との比較を行った。

【0111】

9-1) 本発明核酸導入法によるラット初代培養前駆脂肪細胞へのオリゴヌクレオチドの導入

1. 細胞の調製

ラット初代培養前駆白色脂肪細胞は株式会社ホクドーより購入した。具体的には、24ウェルプレート (Nalge Nunc) に100000細胞/ウェルの密度で細胞を播いた状態で入荷し、入荷後直ちに添付の生育培地に交換し培養を行った。

2. オリゴヌクレオチド含有高張液の調製

オリゴヌクレオチド含有高張液は以下の組成: 10 μ M FITC標識オリゴヌクレオチド (18-mer; 5'-GGA ACT TCC CTA AAG GGA GG -3'; 配列番号: 1)、1M ショ糖、10%(w/v) ポリエチレングリコール1000、RPMI1640 (Invitrogen)、5%(v/v) ウシ胎児血清、10mM HEPES緩衝液 (pH7.4) になるように調製した。

3. 低張液の調製

低張液は、RPMI1640培地: DEPC処理水 (6:4) 混合液になるように調製した。

【0112】

4. 生育培地

ホクドーの培養キットに添付の培地を用いた。

5. 24well plateでの導入

前駆白色脂肪細胞の培養上清を除き、オリゴヌクレオチド含有高張液を400 μ l 添加した。室温で10分間保温したのち、オリゴヌクレオチド含有高張液を除き、低張液3mlを添加し、すぐに低張液を除いた。再び低張液3mlを添加し、室温で2分間保温したのち低張液を除去し、増殖培地3mlを添加した。

【0113】

6. 導入効率の観察

導入効率の観察は蛍光顕微鏡システム：紫外光源アキシオバード135用蛍光検鏡装置(Carl Zeiss)による励起光をFITCバンドパスフィルターを通し、20x対物レンズ、超高感度CCDカメラ(浜松ホトニクス)搭載微分干渉顕微鏡アキシオバード135(Carl Zeiss)を用いて実施した。導入24時間後にFITCの蛍光を上記蛍光顕微鏡システムによって2秒間露光して撮影した。細胞の形態は同システムにて可視光源、フィルターなしの条件下で0.03秒間露光して撮影した。

【0114】

9-2) Oligofectamineによるラット初代培養前駆脂肪細胞へのオリゴヌクレオチドの導入

1. 細胞の調製

ラット初代培養前駆白色脂肪細胞は株式会社ホクドーより購入した。具体的には、24ウェルプレート(Nalge Nunc)に100000細胞/ウェルの密度で細胞を播いた状態で入荷し、入荷後直ちに添付の生育培地に交換し培養を行った。

2. オリゴヌクレオチドの導入

オリゴヌクレオチド/Oligofectamine混合液の調製はInvitrogen社の推奨マニュアルに従って実施した。具体的には、Oligofectamine $9\mu\text{l}$ を $150\mu\text{l}$ のOPTI-MEMI(Invitrogen)に懸濁し、室温で5分間静置後、等量のオリゴヌクレオチド希釈液($20\mu\text{M}$ FITC標識オリゴヌクレオチド $9\mu\text{l}$ と $150\mu\text{l}$ のOPTI-MEMIの混合液)と混和し、20分間室温に置いたものをオリゴヌクレオチド/Oligofectamine混合液として用いた。その後、上記24wellプレートで調製した細胞をOPTI-MEMIにて洗浄、培養上清を除去し、オリゴヌクレオチド/Oligofectamine 2000混合液 $318\mu\text{l}$ を静かに加え、6時間 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 下で静置後、上清を除去し、生育培地を3ml添加し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 下で導入後24時間培養を行った。

3. 導入効率の観察

導入効率の観察は上記実施例9-1)と同様にCCDカメラを用いて実施した。

【0115】

9-3) Lipofectamine2000によるラット初代培養前駆脂肪細胞へのオリゴヌクレオ

チドの導入

1. 細胞の調製

ラット初代培養前駆白色脂肪細胞は株式会社ホクドーより購入した。具体的には、24ウェルプレート (Nalge Nunc) に100000細胞/ウェルの密度で細胞を播いた状態で入荷し、入荷後直ちに添付の生育培地に交換し培養を行った。

2. オリゴヌクレオチドの導入

オリゴヌクレオチド/Lipofectamine2000混合液の調製はInvitrogen社の推奨マニュアルに従って実施した。具体的には、Lipofectamine2000 $3\mu\text{l}$ を $150\mu\text{l}$ のOPTI-MEMI (Invitrogen) に懸濁し、室温で5分間静置後、等量のオリゴヌクレオチド希釈液 ($20\mu\text{M}$ FITC標識オリゴヌクレオチド $3\mu\text{l}$ と $150\mu\text{l}$ のOPTI-MEMIの混合液) と混和し、20分間室温に置いたものをオリゴヌクレオチド/Lipofectamine2000混合液として用いた。その後、上記24wellプレートで調製した細胞をOPTI-MEMIにて洗浄、培養上清を除去し、オリゴヌクレオチド/Lipofectamine2000混合液 $306\mu\text{l}$ を静かに加え、6時間 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 下で静置後、上清を除去し、生育培地を 3ml 添加し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 下で導入後24時間培養を行った。

3. 導入効率の観察

導入効率の観察は上記実施例9-1)と同様にCCDカメラを用いて実施した。

【0116】

9-4) 本発明核酸導入法、Oligofectamine法およびLipofectamine2000法によるラット初代培養前駆脂肪細胞へのオリゴヌクレオチド導入結果の比較

前記本発明核酸導入法、Oligofectamine法およびLipofectamine法によるFITC標識オリゴヌクレオチド導入24時間後の細胞の形態、細胞へのダメージおよび導入効率を比較した。

その結果、本発明核酸導入法では細胞の形態変化、ダメージはみとめられず、視野中の80%程度の細胞にオリゴヌクレオチドの導入がみとめられた。一方、Oligofectamine法およびLipofectamine法では視野中のほとんどの細胞にFITCオリゴヌクレオチドの導入がみとめられなかった。これらの結果から、本発明核酸導入法は、Oligofectamine法およびLipofectamine法とは異なり、細胞に形態変化やダメージを与えることなく、ラット初代培養前駆脂肪細胞へもオリゴヌクレオチ

ドを導入できることが分かった。

【0117】

実施例 10

高張液のシヨ糖濃度が導入効率に及ぼす効果に関する検討

高張液中のシヨ糖以外の組成は実施例1-1)と同様に保ったまま、シヨ糖の濃度を0.5M、0.75M、1Mと変化させた時の導入効率の変化について調べた。

1. 細胞の調製

RAW264.7細胞 (ATCC No. TIB-71) を10%(v/v)ウシ胎児血清含有RPMI1640 (Invitrogen) に懸濁し、24ウェルプレート (Nalge Nunc) に100000細胞/ウェルの密度で細胞を播き、37℃、5%CO₂の条件で一晩培養した。

2. オリゴヌクレオチド含有高張液の調製

オリゴヌクレオチド含有高張液は以下の組成: 10 μ M FITC標識オリゴヌクレオチド (18-mer; 5'- GGA ACT TCC CTA AAG GGA GG -3'; 配列番号: 1)、0.5M、0.75Mまたは1Mシヨ糖、10%(w/v) ポリエチレングリコール1000、RPMI1640 (Invitrogen)、5%(v/v)ウシ胎児血清、10mM HEPES緩衝液 (pH7.4) になるように調製した。

【0118】

3. 低張液の調製

低張液は、RPMI1640培地: DEPC処理水 (6:4) 混合液になるように調製した。

4. 生育培地

RPMI1640 (Invitrogen) にウシ胎児血清、硫酸カナマイシンをそれぞれ10% (v/v)、60mg/L加えて調製した。

5. 24well plateでの導入

RAW264.7細胞を各wellに100,000細胞ずつ播き、終夜培養したのちに培養上清を除き、オリゴヌクレオチド含有高張液を400 μ l添加した。次に、室温で10分間保温したのち、オリゴヌクレオチド含有高張液を除き、低張液3mlを添加し、すぐに低張液を除いた。再び低張液3mlを添加し、室温で2分間保温したのち低張液を除去し、増殖培地3mlを添加した。

【0119】

6. 導入効率の観察

導入効率の観察は蛍光顕微鏡システム：紫外光源アキシオバード135用蛍光検鏡装置(Carl Zeiss)による励起光をFITCバンドパスフィルターを通し、20x対物レンズ、超高感度CCDカメラ(浜松ホトニクス)搭載微分干渉顕微鏡アキシオバード135(Carl Zeiss)を用いて実施した。導入24時間後にFITCの蛍光を上記蛍光顕微鏡システムによって2秒間露光して撮影した。細胞の形態は同システムにて可視光源、フィルターなしの条件下で0.03秒間露光して撮影した。

7. 結果

0.75Mおよび1M ショ糖含有高張液を用いた場合は視野中のほとんどすべての細胞に蛍光オリゴヌクレオチドの導入がみとめられた。0.5Mショ糖含有高張液を用いた場合は、0.75Mおよび1Mショ糖含有高張液を用いた場合に比してやや少なかったものの、細胞への蛍光オリゴヌクレオチドの導入がみとめられた。またいずれのショ糖濃度含有高張液を用いた場合においても明視野中の細胞に形態変化、細胞死はみとめられなかった。以上の結果から、高張液中のショ糖濃度としては0.5M~1Mがより好ましいことが分かった。

【0120】

実施例 11

高張液の糖の種類が導入効率に及ぼす効果に関する検討

高張液中の溶質のモル濃度は実施例 1-1)と同様に保ったまま、糖の種類をショ糖、マンニトール、ソルビトール、あるいはキシリトールと変化させた時の導入効率の変化について調べた。

【0121】

1. 細胞の調製

RAW264.7細胞(ATCC No.TIB-71)を10%(v/v)ウシ胎仔血清含有RPMI1640(Invitrogen)に懸濁し、24ウェルプレート(Nalge Nunc)に100000細胞/ウェルの密度で細胞を播き、37℃、5%CO₂の条件で一晩培養した。

2. オリゴヌクレオチド含有高張液の調製

オリゴヌクレオチド含有高張液は以下の組成：10 μ M FITC標識オリゴヌクレオチド(18-mer；5'-GGA ACT TCC CTA AAG GGA GG -3'；配列番号：1)、1Mの

各種糖（ショ糖、マンニトール、ソルビトールあるいはキシリトール）、10%(w/v)ポリエチレングリコール1000、RPMI1640（Invitrogen）、5%(v/v)ウシ胎児血清、10mM HEPES緩衝液（pH7.4）になるように調製した。

3. 低張液の調製

低張液は、RPMI1640培地：DEPC処理水（6:4）混合液になるように調製した。

【0122】

4. 生育培地

RPMI1640（Invitrogen）にウシ胎児血清、硫酸カナマイシンをそれぞれ10%（v/v）、60mg/L加えて調製した。

5. 24well plateでの導入

RAW264.7細胞を各wellに100,000細胞ずつ播き、終夜培養したのちに培養上清を除き、オリゴヌクレオチド含有高張液を400 μ l添加した。次に、室温で10分間保温したのち、オリゴヌクレオチド含有高張液を除き、低張液3mlを添加し、すぐに低張液を除いた。再び低張液3mlを添加し、室温で2分間保温したのち低張液を除去し、増殖培地3mlを添加した。

【0123】

6. 導入効率の観察

導入効率の観察は蛍光顕微鏡システム：紫外光源アキシオバード135用蛍光検鏡装置(Carl Zeiss)による励起光をFITCバンドパスフィルターを通し、20x対物レンズ、超高感度CCDカメラ(浜松ホトニクス)搭載微分干渉顕微鏡アキシオバード135(Carl Zeiss)を用いて実施した。導入24時間後にFITCの蛍光を上記蛍光顕微鏡システムによって2秒間露光して撮影した。細胞の形態は同システムにて可視光源、フィルターなしの条件下で0.03秒間露光して撮影した。

7. 結果

ショ糖、マンニトール、ソルビトールあるいはキシリトールのいずれの糖でも、導入効率に相違はみとめられなかった。これらの結果から、高張液の溶質として、いずれの糖も用いることができることが分かった。

【0124】

実施例 12

高張液のPEGの種類が導入効率に及ぼす効果に関する検討

高張液中の溶質のモル濃度は実施例1-1)と同様に保ったまま、PEGの種類をPEG 200、PEG300、PEG400、PEG600、PEG1000、PEG1500、PEG1540またはPEG2000と変化させた時の導入効率の変化について調べた。

1. 細胞の調製

RAW264.7細胞 (ATCC No. TIB-71) を10%(v/v)ウシ胎仔血清含有RPMI1640 (Invitrogen) に懸濁し、24ウェルプレート (Nalge Nunc) に100000細胞/ウェルの密度で細胞を播き、37℃、5%CO₂の条件で一晩培養した。

【0125】

2. オリゴヌクレオチド含有高張液の調製

オリゴヌクレオチド含有高張液は以下の組成: 10 μ M FITC標識オリゴヌクレオチド (18-mer; 5'-GGA ACT TCC CTA AAG GGA GG -3'; 配列番号: 1)、1 M ショ糖、10%(w/v) (=100mM) ポリエチレングリコール1000あるいは等モル濃度のPEG (PEG200、PEG300、PEG400、PEG600、PEG1000、PEG1500、PEG1540またはPEG2000)、RPMI1640 (Invitrogen)、5%(v/v)ウシ胎児血清、10mM HEPES緩衝液 (pH7.4) になるように調製した。

3. 低張液の調製

低張液は、RPMI1640培地: DEPC処理水 (6:4) 混合液になるように調製した。

【0126】

4. 生育培地

RPMI1640 (Invitrogen) にウシ胎児血清、硫酸カナマイシンをそれぞれ10% (v/v)、60mg/L加えて調製した。

5. 24well plateでの導入

RAW264.7細胞を各wellに100,000細胞ずつ播き、終夜培養したのちに培養上清を除き、オリゴヌクレオチド含有高張液を400 μ l添加した。次に、室温で10分間保温したのち、オリゴヌクレオチド含有高張液を除き、低張液3mlを添加し、すぐに低張液を除いた。再び低張液3mlを添加し、室温で2分間保温したのち低張液を除去し、増殖培地3mlを添加した。

【0127】

6. 導入効率の観察

導入効率の観察は蛍光顕微鏡システム：紫外光源アキシオバード135用蛍光検鏡装置(Carl Zeiss)による励起光をFITCバンドパスフィルターを通し、20x対物レンズ、超高感度CCDカメラ(浜松ホトニクス)搭載微分干渉顕微鏡アキシオバード135 (Carl Zeiss) を用いて実施した。導入24時間後にFITCの蛍光を上記蛍光顕微鏡システムによって2秒間露光して撮影した。細胞の形態は同システムにて可視光源、フィルターなしの条件下で0.03秒間露光して撮影した。

7. 結果

PEGのポリマー化の程度(平均分子量)を問わず、導入効率に相違はみとめられなかった。これらの結果から、高張液の溶質として、いずれのポリマー化の程度(平均分子量)のPEGも用いることができることが分かった。

【0128】

実施例 13

高張液のPEGをグリセリンと置換した場合に導入効率に及ぼす効果に関する検討

高張液中の溶質のモル濃度は実施例1-1)と同様に保ったまま、10%(w/v) (=100 mM) PEG1000を等モル濃度のグリセリンに置換した場合の導入効率の変化について調べた。

1. 細胞の調製

RAW264.7細胞(ATCC No.TIB-71)を10%(v/v)ウシ胎仔血清含有RPMI1640 (Invitrogen) に懸濁し、24ウェルプレート(Nalge Nunc)に100000細胞/ウェルの密度で細胞を播き、37℃、5%CO₂の条件で一晩培養した。

【0129】

2. オリゴヌクレオチド含有高張液の調製

オリゴヌクレオチド含有高張液は以下の組成：10 μ M FITC標識オリゴヌクレオチド(18-mer; 5'-GGA ACT TCC CTA AAG GGA GG -3'; 配列番号: 1)、1Mシヨ糖、10%(w/v) (=100 mM) ポリエチレングリコール1000あるいは100 mM グリセリン、RPMI1640 (Invitrogen)、5%(v/v)ウシ胎児血清、10mM HEPES緩衝液(pH7.4)になるように調製した。

3. 低張液の調製

低張液は、RPMI1640培地：DEPC処理水（6:4）混合液になるように調製した。

【0130】

4. 生育培地

RPMI1640（Invitrogen）にウシ胎児血清、硫酸カナマイシンをそれぞれ10%（v/v）、60mg/L加えて調製した。

5. 24well plateでの導入

RAW264.7細胞を各wellに100,000細胞ずつ播き、終夜培養したのちに培養上清を除き、オリゴヌクレオチド含有高張液を400 μ l添加した。次に、室温で10分間保温したのち、オリゴヌクレオチド含有高張液を除き、低張液3mlを添加し、すぐに低張液を除いた。再び低張液3mlを添加し、室温で2分間保温したのち低張液を除去し、増殖培地3mlを添加した。

【0131】

6. 導入効率の観察

導入効率の観察は蛍光顕微鏡システム：紫外光源アキシオバード135用蛍光検鏡装置（Carl Zeiss）による励起光をFITCバンドパスフィルターを通し、20x対物レンズ、超高感度CCDカメラ（浜松ホトニクス）搭載微分干渉顕微鏡アキシオバード135（Carl Zeiss）を用いて実施した。導入24時間後にFITCの蛍光を上記蛍光顕微鏡システムによって2秒間露光して撮影した。細胞の形態は同システムにて可視光源、フィルターなしの条件下で0.03秒間露光して撮影した。

7. 結果

PEGだけでなくグリセリンを用いた場合も導入効率に相違はみとめられなかった。これらの結果から、高張液の溶質として、PEGだけでなくグリセリンも用いることができることが分かった。

【0132】

実施例 14

実施例1-1)の高張液のPEGとショ糖を等モル濃度のショ糖または糖アルコールと置換した場合に導入効率に及ぼす効果に関する検討

高張液中の溶質のモル濃度は実施例1-1)と同様に保ったまま、10%(w/v) (=100 mM) PEG1000と1Mショ糖を等モル濃度のショ糖、ソルビトール、マンニトールま

たはキシリトールに置換した場合の導入効率の変化について調べた。

1. 細胞の調製

RAW264.7細胞 (ATCC No. TIB-71) を10%(v/v)ウシ胎児血清含有RPMI1640 (Invitrogen) に懸濁し、24ウェルプレート (Nalge Nunc) に100000細胞/ウェルの密度で細胞を播き、37℃、5%CO₂の条件で一晩培養した。

【0133】

2. オリゴヌクレオチド含有高張液の調製

オリゴヌクレオチド含有高張液は以下の組成: 10 μ M FITC標識オリゴヌクレオチド (18-mer; 5'-GGA ACT TCC CTA AAG GGA GG -3'; 配列番号: 1)、1Mシヨ糖と10%(w/v) (= 100 mM) PEG1000、または1.1Mの各種糖 (シヨ糖、ソルビトール、マンニトールまたはキシリトール)、RPMI1640 (Invitrogen)、5%(v/v)ウシ胎児血清、10mM HEPES緩衝液 (pH7.4) になるように調製した。

3. 低張液の調製

低張液は、RPMI1640培地: DEPC処理水 (6:4) 混合液になるように調製した。

【0134】

4. 生育培地

RPMI1640 (Invitrogen) にウシ胎児血清、硫酸カナマイシンをそれぞれ10% (v/v)、60mg/L加えて調製した。

5. 24well plateでの導入

RAW264.7細胞を各wellに100,000細胞ずつ播き、終夜培養したのちに培養上清を除き、オリゴヌクレオチド含有高張液を400 μ l添加した。次に、室温で10分間保温したのち、オリゴヌクレオチド含有高張液を除き、低張液3mlを添加し、すぐに低張液を除いた。再び低張液3mlを添加し、室温で2分間保温したのち低張液を除去し、増殖培地3mlを添加した。

【0135】

6. 導入効率の観察

導入効率の観察は蛍光顕微鏡システム: 紫外光源アキシオバード135用蛍光検鏡装置 (Carl Zeiss) による励起光をFITCバンドパスフィルターを通し、20x対物レンズ、超高感度CCDカメラ (浜松ホトニクス) 搭載微分干渉顕微鏡アキシオバ

ード135 (Carl Zeiss) を用いて実施した。導入24時間後にFITCの蛍光を上記蛍光顕微鏡システムによって2秒間露光して撮影した。細胞の形態は同システムにて可視光源、フィルターなしの条件下で0.03秒間露光して撮影した。

7. 結果

同じモル濃度 (1.1M) であれば、PEGとショ糖の混合物だけでなく各種糖単体 (ショ糖、ソルビトール、マンニトール、キシリトール) を用いた場合もオリゴヌクレオチドの導入が可能であることが分かった。これらの結果から、高張液の溶質として、PEGとショ糖の混合物だけでなく各成分単体も用いることができることが分かった。

【0136】

以上の実施例1~14の結果より以下のことが明らかとなった。

- 1) 本発明の核酸導入法は、従来法になく核酸導入効率が高いことが分かった。
- 2) 本発明の核酸導入法は、従来法と異なり、細胞に形態変化やダメージを与えることなく核酸を導入出来ることが分かった。また導入された核酸は細胞内で有効に機能することが分かった。
- 3) 本発明の核酸導入法は、従来核酸導入が困難であると言われていた細胞 (マクロファージ由来RAW264.7細胞、初代培養肝細胞、初代培養筋芽細胞、初代培養筋細胞、初代培養前駆脂肪細胞、初代培養脂肪細胞、初代培養神経細胞等) へも効率的な導入が可能であり、適応細胞種の制限無く使用できることが分かった。

【0137】

- 4) 本発明の核酸導入法において用いられる高張液の成分としては、オリゴ糖、多価アルコールが挙げられ、具体的にはポリエチレングリコール、グリセリン、ショ糖、糖アルコール (マンニトール、ソルビトール、キシリトール等) 等、種類を問わず使用できることが分かった。
- 5) 本発明の核酸導入法において用いられる高張液中の溶質全体のモル濃度は、0.5M~1.1M程度が好ましいことが分かった。

【0138】

【発明の効果】

本発明の新規な核酸導入法は、従来になく高い効率で核酸を導入することがで

きる。しかも本発明の核酸導入法は、細胞に形態変化やダメージを与えることなく核酸を導入することができるため、導入された核酸は細胞内で有効に機能することができる。また本発明の導入法は、従来核酸導入が困難であると言われていた細胞へも効率良く核酸を導入することができる。従って本発明の核酸導入法は、従来解析不能であったあらゆる細胞を対象とした遺伝子機能解析（例えば受容体ーリガンド対の同定などの遺伝子機能解析）に極めて有効に用いることができる。

【0139】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.

Sumitomo Chemical Co., Ltd.

<120> Nucleic Acid Delivery System

<130> 133132

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic

Oligonucleotide

<400> 1

ggaacttccc taaagggagg

20

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic

Oligonucleotide

<400> 2

auccacaagu caaucucucu u

21

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic

Oligonucleotide

<400> 3

gagagauuga cuuguggauu u

21

【図面の簡単な説明】**【図 1】**

図 1 は、本発明核酸導入法（上段）、Oligofectamine法（中段）およびポリエチレンイミン法（下段）によるマウスマクロファージ細胞株RAW264.7細胞へのオリゴヌクレオチドの導入結果を示す。図中、左側は導入細胞の明視野像を、また右側は蛍光視野像を示す。

【図 2】

図 2 は、本発明核酸導入法によりRAW264.7細胞にTLR4 siRNAを導入し、定量的PCRによりsiRNA効果を測定した結果を示す。

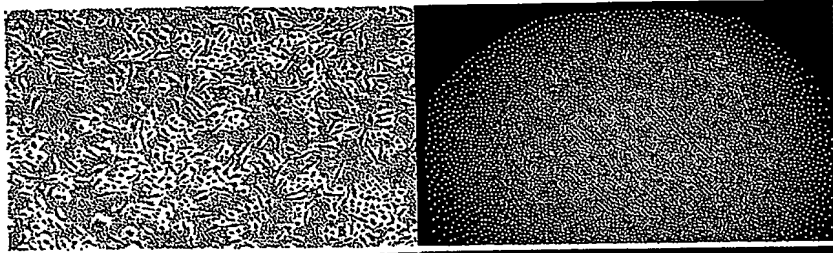
【図 3】

図 3 は、本発明核酸導入法によりRAW264.7細胞にTLR4 siRNAを導入し、LPSまたはGLA-60刺激によるTNF α 産生の抑制効果を測定した結果を示す。

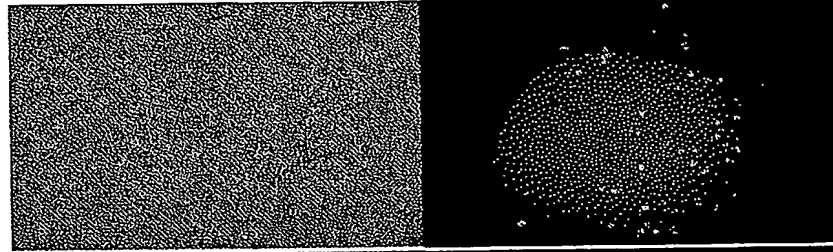
【書類名】 図面

【図 1】

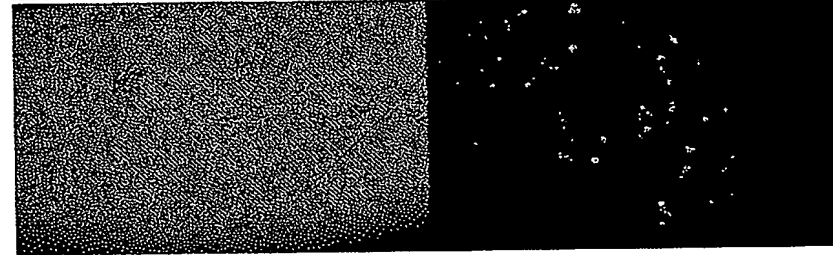
本発明核酸導入法



Oligofectamine法

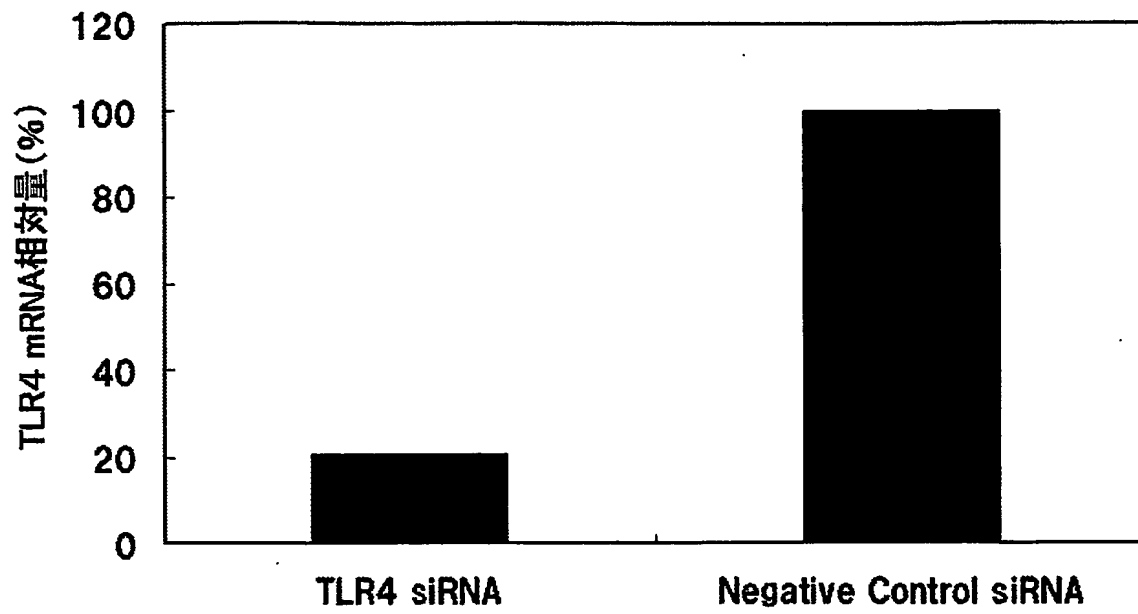


ポリエチレンイミン法

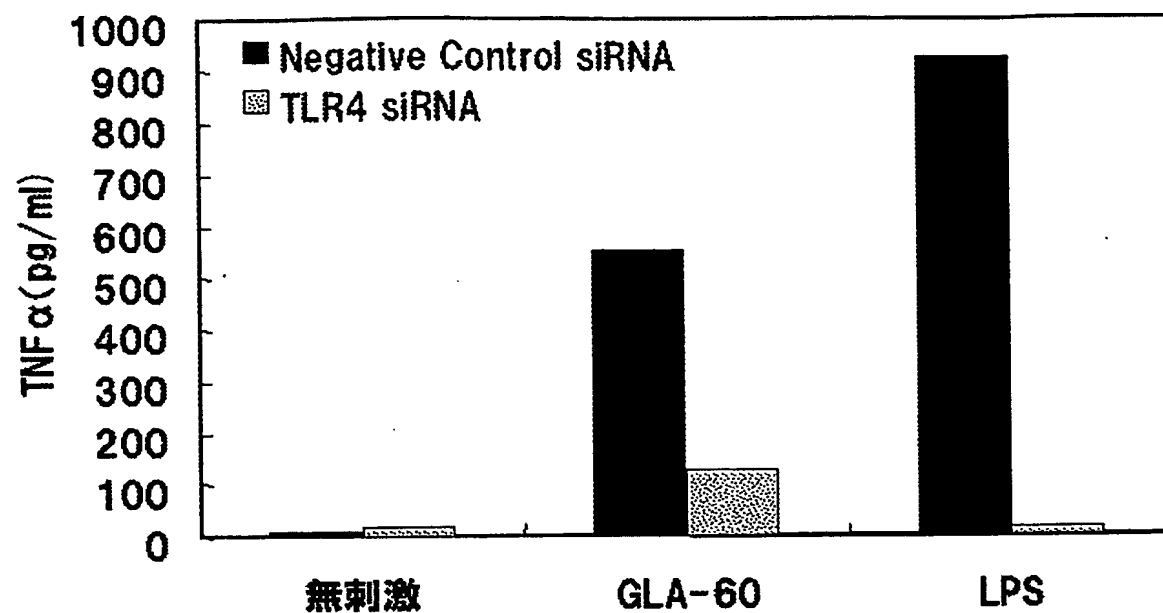


BEST AVAILABLE COPY

【図 2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規な核酸導入法および核酸導入用試薬を提供する。

【解決手段】 (a) 核酸を含有する高張液と細胞とを接触させる工程、および (b) 前記 (a) 工程の後、高張液の浸透圧を低下させる工程、を含む核酸導入法、およびオリゴ糖及び多価アルコールから選択される少なくとも 1 種を成分として含有する核酸導入用試薬。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 1 6 1 4 9 8
受付番号	5 0 3 0 0 9 4 8 8 3 6
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 5 年 6 月 9 日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 6月 6日
-------	-------------

次頁無

特願 2 0 0 3 - 1 6 1 4 9 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 1 8 3 3 7 0]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 9 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区道修町 2 丁目 2 番 8 号

氏 名

住友製薬株式会社

特願 2003-161498

出願人履歴情報

識別番号

[000002093]

1. 変更年月日

1990年 8月28日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

氏 名

住友化学工業株式会社